



La dérégulation de l'axe GH/EGFR inhibe la régénération du foie dans le cadre de la stéatose hépatique

Alexandra Collin de L'Hortet

► To cite this version:

Alexandra Collin de L'Hortet. La dérégulation de l'axe GH/EGFR inhibe la régénération du foie dans le cadre de la stéatose hépatique. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T003 . tel-00986411

HAL Id: tel-00986411

<https://theses.hal.science/tel-00986411>

Submitted on 2 May 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité **Sciences du Vivant**

Ecole doctorale Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et
Infectiologie (Paris)

Présentée par

Alexandra COLLIN DE L'HORTET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Sujet de la thèse :

**LA DÉRÉGULATION DE L'AXE GH/EGFR
INHIBE LA RÉGÉNÉRATION DU FOIE DANS
LE CADRE DE LA STÉATOSE HÉPATIQUE**

soutenue publiquement le 04 Avril 2014

devant le jury composé de :

Président	M. Marc DELPECH
Rapporteurs	Mme Christèle DESBOIS-MOUTHON M. Thierry TORDJMAN
Examineurs	M. Bernard FROMENTY Mme Dina KREMSDORF
Directrice	Mme Hélène GILGENKRANTZ
Encadrant	M. Jacques-Emmanuel GUIDOTTI

A l'homme au sourire espiègle,

Remerciements

Il y a quatre ans maintenant, j'ai commencé la plus délicate des aventures académiques, bien décidée à dompter cette « thèse » dans toutes ces sinuosités scientifiques. A terme, deux évidences se sont imposées à moi. En premier lieu, le doctorat n'est pas seulement un travail de recherche scientifique. C'est un voyage intellectuel, une promenade tout aussi professionnelle que personnelle, opérant une maturation de la pensée. D'autre part, loin d'être un périple en solitaire, le doctorat ne s'accomplit qu'à la faveur d'un entourage présent et actif. N'ayant jamais été de nature à manifester verbalement ma considération à votre égard, j'espère que ces quelques lignes vous rendront justice à tous.

Dans cette dernière ligne droite, je n'aurais pu arriver à bon port sans votre implication. En conséquence, Mesdames et Messieurs les membres du jury, il est important pour moi de vous signifier ma reconnaissance. J'exprime ma gratitude à Monsieur Marc Delpech, de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. J'apprécie l'intérêt que portent Madame Christèle Desbois-Mouthon et Monsieur Thierry Tordjmann en acceptant de juger ce travail. Il m'est également très plaisant que Madame Dina Kremsdorf et Monsieur Bernard Fromenty consentent à examiner ce manuscrit.

Bien évidemment, aux deux personnes qui m'ont guidée tout au long de cette expédition, je souhaite exprimer mes plus sincères remerciements.

Hélène, tu m'as permis d'appréhender le visage humain de la recherche et c'est une notion dont je me suis nourrie pendant quatre ans. J'ai appris de la façon dont tu réfléchis, dont tu communique et articules tes raisonnements. J'ai aimé l'élégance avec laquelle tu m'as accordé ta confiance, en toute sincérité. J'ai apprécié ta curiosité qui, loin de se restreindre aux sciences, s'exporte vers un champ bien plus large de connaissance : une qualité rare.

Jacques, j'ai admiré ton remarquable enthousiasme pour la recherche, s'exprimant par ton foisonnement d'idées régulier. J'ai adoré nos nombreuses discussions, que nous partagions toujours avec un respect et une estime réciproques. Tu m'as souvent surprise par ta perspicacité et ta vivacité d'esprit au service d'une obstination communicative. J'en suis sortie grandie et entretiens l'espoir de transmettre quelques unes de ces qualités à mon tour.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe avec qui j'ai partagé le laboratoire, mais également des discussions, des congrès et quelques péripéties.

Mathieu, je garde un précieux souvenir de nos débats enflammés, tantôt par la musique, tantôt par une volonté acharnée de convaincre. Dominique, nos conversations authentiques sur nos parcours de vie respectifs me manqueront assurément. Chantal, ton honnêteté de parole mais aussi ta bienveillance à mon égard m'ont touchée. Séverine, moi et d'autres te sommes reconnaissants pour ta gentillesse et le temps que tu consacres à autrui. Géraldine, tu as été un miroir d'émotions et d'expériences, notamment en début de doctorat. Vanessa, ton sens de l'humour

et ta bonne humeur étaient souvent rafraichissants. Merci aux nouvelles, Sophie, Emilie et Manon qui ont apporté un souffle nouveau dans le laboratoire. Je me souviendrai de ton soutien et ton aide Jean-Pierre. Une pensée également pour les anciens, Amal, Martine, Yann et Grégory. . .

Véronique, tu as été la condition indispensable de ce projet mais aussi, une personnalité attachante avec laquelle il était agréable d'échanger sur des sujets très variés. Je te remercie pour ta patience, les nombreuses expériences recommencées et pour ta coopération pendant quatre ans. Carina, ce fut très plaisant de collaborer ensemble, d'échanger informations et données, mais également de pouvoir discuter librement avec toi. Au sympathique homme blanc caché en permanence derrière une charlotte et un masque, Olivier, ton aide m'a vraiment été précieuse. Je remercie le secrétariat, Yannig et Catherine, dont la bonne humeur et les plaisanteries m'ont souvent fait sourire. Maria Angeles, ton franc parler et ton attitude protectrice envers les jeunes chercheurs en ont servi beaucoup, moi y compris. Et bien sûr, tous les autres, avec qui j'ai parcouru un bout de chemin ou que j'ai croisé sur la route. . .

Sans pour autant être intervenus directement dans mon travail, beaucoup de personnes ont contribué à mon équilibre et à mon épanouissement pendant ce temps. Ainsi, nombreux sont ceux qui, à leur façon, ont permis le bon déroulement de ce doctorat.

Je pense à l'ensemble des membres passés et présents de JeCCo. Partager à la fois nos activités de jeunes chercheurs et un investissement associatif professionnel n'a fait qu'enrichir mon expérience de doctorante.

J'ai une affection toute particulière pour les différentes personnes rencontrées par l'intermédiaire de la Confédération des Jeunes Chercheurs. J'ai appris à connaître des gens d'une grande sagacité, avec lesquels il a toujours été agréable de réfléchir, proposer et travailler ensemble. Parmi d'autres choses, j'ai compris grâce à vous ce que signifiait être chercheur et faire un doctorat, indépendamment des disciplines. . .

Je tiens également à adresser un mot à l'ensemble de mes amis, ceux de Tours, de Paris et d'ailleurs. Vous avez sans conteste représenté une bouffée d'oxygène régulière. J'ai vécu des moments éminemment précieux en votre compagnie, en partageant une colocation avec vous, des activités sportives, une expérience commune de PhD, ou encore grâce à de nombreuses soirées, où faire de l'esprit et du second degré étaient les maîtres-mots de nos échanges.

Enfin, à ma famille. . . à vous qui m'avez suivi tout au long de ces années contre vents et marées, à vous qui m'avez toujours fait confiance et porté beaucoup d'es-time. J'ai grandi grâce et à travers notre histoire familiale, je vous dois beaucoup, dont certainement cette singularité qui participe à mon épanouissement aujourd'hui. Je vous remercie tous très chaleureusement.

Alexandra

Résumé

Ce travail doctoral est centré sur la régénération du foie en conditions normales et au cours de la stéatose hépatique. Ces dernières décennies, de nombreux travaux ont utilisé des modèles d'invalidations géniques afin d'identifier les acteurs importants au cours de la régénération hépatique. Dans ce contexte, il avait été observé que des animaux dont le signal de l'hormone de croissance était inhibé présentait un défaut majeur de prolifération hépatocytaire après hépatectomie. Dans un premier temps, notre laboratoire s'est donc intéressé à comprendre comment l'hormone de croissance contrôle la régénération hépatique au niveau moléculaire. Pour cela, nous avons pratiqué des hépatectomies sur des animaux dépourvus en récepteur de l'hormone de croissance (GHRKO). Nous avons ainsi montré que l'hormone de croissance jouait un rôle majeur au cours de la régénération hépatique en contrôlant l'expression d'EGFR ainsi que l'activation de Erk1/2. Dans un second temps, je me suis intéressée à une situation pathologique associée à une dérégulation de la voie de l'hormone de croissance : la stéatose hépatique. De façon intéressante, de nombreux modèles murins de stéatose hépatique présentent également une inhibition importante de la prolifération après hépatectomie partielle. Chez l'Homme, cette maladie (NAFLD pour *Non alcoholic fatty liver disease*) représente un facteur de risque lors de transplantations hépatiques et de résections majeures du foie. Grâce à l'analyse quantifiée de plusieurs paramètres issue de biopsies de patients obèses, nous avons montré l'existence d'une forte corrélation entre stéatose hépatique et diminution de l'expression de l'EGFR sur l'Homme. Nous avons également pratiqué des hépatectomies sur deux modèles de stéatose, l'un génétique (*ob/ob*) l'autre induit par un régime déficient en méthionine et choline (MCD). Les cinétiques de régénération post hépatectomie nous ont permis de confirmer un défaut de régénération hépatique chez les souris *ob/ob* et MCD. D'autre part, l'étude de ces modèles de stéatose nous a amenés à valider la dérégulation de la voie de l'hormone de croissance et la diminution transcriptionnelle de l'EGFR avant et après hépatectomie partielle. En parallèle, nous avons souligné l'implication de la voie inhibitrice de prolifération TGF- β , dans l'altération de la prolifération hépatocytaire des animaux *ob/ob*. En effet, de nombreux acteurs de cette voie sont surexprimés après l'hépatectomie partielle, participant certainement au défaut de régénération plus drastique observé sur ce modèle. Pour finir, nous avons également montré que l'injection sur une courte période d'hormone de croissance sur les animaux *ob/ob* restaure la prolifération hépatocytaire post hépatectomie. Ce sauvetage phénotypique est associé à une réexpression transcriptionnelle et protéique de l'EGFR. A terme, ces travaux nous amènent à proposer que la dérégulation de l'axe hormone de croissance/EGFR représente un mécanisme général associé à la stéatose hépatique et responsable du défaut de régénération du foie lié à cette maladie.

Abstract

This doctoral work focused on liver regeneration in physiological conditions and during steatosis. These last decades, several studies used gene invalidation models to identify important actors during the liver regeneration. In this context, it had been observed that animals displaying a defect of growth hormone pathway had a drastic defect of liver regeneration after partial hepatectomy. Initially, we started this work by focusing on understanding how growth hormone controls liver regeneration at the molecular level. To do so, we performed partial hepatectomies on animals deleted for the growth hormone receptor gene (GHRKO). These results showed that growth hormone plays a central role in the control of liver regeneration through the expression of EGFR and the activation of Erk1/2. Secondly, we focused our attention on a pathological situation showing a defect of growth hormone signaling : hepatic steatosis. Interestingly, many mice models of hepatic steatosis also present a drastic inhibition of hepatocytes proliferation after partial hepatectomy. In Humans, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents an important risk factor regarding liver transplantations and resections. Through quantified analysis of several parameters from obese patient biopsies, we showed the existence of a strong correlation between hepatic steatosis and decrease in EGFR expression on humans. We also performed partial hepatectomies on two models of hepatic steatosis, one being genetic (*ob/ob*) and the other one being induced by a methionine choline deficient diet (MCD). Kinetics of regeneration post hepatectomy led us to confirm the defect of liver regeneration in on *ob/ob* and MCD mice. Moreover, the study of these steatotic models allowed us to corroborate the downregulation of the growth hormone signaling and the transcriptional decrease of EGFR expression. We also underlight the importance of TGF- β , a signaling pathway inhibiting proliferation, in the liver regeneration defect observed in *ob/ob* mice. Indeed, many members of this pathway have been found to be upregulated after partial hepatectomy, possibly being involved in the drastic regeneration defect observed in *ob/ob* mice. To finish, we also showed that growth hormone injections on a small period of time in *ob/ob* mice were capable of rescuing hepatocyte proliferation post hepatectomy. This phenotypic rescue was associated with a reexpression of EGFR at the transcription and protein level. This work led us to propose that the defect of the growth hormone/EGFR pathway represents a general mechanism associated with hepatic steatosis and is responsible for the liver regeneration defect linked to this disease.

Table des matières

I	INTRODUCTION	23
1	Quelques généralités sur le foie	25
1.1	Un brin d'histoire	25
1.2	Une vision histologique	26
1.2.1	Le lobule hépatique	26
1.2.2	Les types cellulaires	27
1.2.3	Une compréhension fonctionnelle	28
2	La stéatose hépatique	33
2.1	Définition de la stéatose hépatique	33
2.1.1	La stéatopathie non-alcoolique	34
2.1.2	La stéatohépatite non-alcoolique	35
2.2	L'épidémiologie de la stéatose hépatique	38
2.2.1	La prévalence	38
2.2.2	Les facteurs de risque	39
2.3	Une porte d'entrée vers d'autres pathologies	41
2.4	Les modèles murins	44
2.4.1	Les modèles de stéatose hépatique	45
2.4.2	Les modèles de stéatohépatite	50
3	La régénération hépatique	55
3.1	Les différents mécanismes de régénération des êtres vivants	55
3.1.1	La régénération tissulaire	55
3.1.2	La régénération morphallactique	55
3.1.3	La régénération épimorphique	56
3.1.4	La régénération compensatrice	56
3.2	Historique de la régénération hépatique	56
3.3	Les applications médicales	57
3.3.1	La transplantation hépatique	57
3.3.2	La résection hépatique	59
3.4	Les modèles de régénération hépatique	59

3.4.1	L'injection de toxines	59
3.4.2	L'hépatectomie partielle	60
3.5	Défaut de régénération en cas de stéatose	69
3.5.1	Stéatose et régénération chez l'Homme	69
3.5.2	Stéatose et régénération sur modèles murins	70
4	La voie de signalisation EGFR dans la régénération hépatique	73
4.1	Description générale	73
4.2	L'EGFR dans le foie	74
4.3	Le contrôle de l'EGFR sur la régénération	76
4.3.1	Par les ligands	76
4.3.2	Par le récepteur	76
5	La voie de signalisation TGF-β	79
5.1	Description générale de la voie TGF- β	79
5.2	Le TGF- β dans le foie	80
5.3	Le contrôle du TGF- β sur la régénération	83
5.3.1	Par le ligand TGF- β 1	84
5.3.2	Par les récepteurs	84
5.3.3	Quelques notions sur la voie de l'activine	85
II	OBJECTIFS ET TRAVAUX	87
6	Le contrôle de l'hormone de croissance sur la régénération hépatique	91
6.1	Concepts généraux sur l'hormone de croissance	92
6.1.1	La transduction du signal de l'hormone de croissance	92
6.1.2	Régulation de l'hormone de croissance	94
6.1.3	Les rôles de l'hormone de croissance	96
6.2	L'implication de l'hormone de croissance au cours de la régénération hépatique	100
6.3	Publication n°1	101
6.3.1	Synthèse	101
6.3.2	Résultats et discussion	114
7	Le défaut de régénération du foie en cas de stéatose hépatique	117
7.1	Obésité, stéatose hépatique et hormone de croissance	117
7.2	Publication n°2	118

7.3	Synthèse	118
7.4	Résultats	145
7.5	Résultats supplémentaires	146
7.5.1	La diminution de l'EGFR associée à la stéatose hépatique : un mécanisme général inhibant la prolifération hépatique?	146
7.5.2	Aller plus loin dans le sauvetage phénotypique en validant le rôle de l'EGFR	149
7.5.3	L'implication d'autres voies de signalisation pour expliquer le défaut de régénération chez les souris <i>ob/ob</i>	154

III DISCUSSION ET PERSPECTIVES 159

8	Discussion des résultats	161
8.1	Les études précédentes sur la régénération du foie en cas de stéatose hépatique divergent	161
8.2	Dérégulation de l'axe GH/EGFR dans la stéatose	162
8.3	Il existe une bonne corrélation entre diminution de l'EGFR et augmentation de la stéatose chez l'Homme	164
8.4	Identification incertaine des voies en aval d'EGFR	165
8.5	Le défaut de régénération hépatique est partiellement restauré par l'injection d'hormone de croissance	168
8.6	Les différences entre <i>ob/ob</i> et MCD	169
9	Des perspectives de travail	173
9.1	Quelques pistes pour aller un peu plus loin	173
9.2	Une ouverture thérapeutique	174
9.3	De la stéatose au cancer : que se passe t-il?	175

IV ANNEXES 215

Table des figures

1.1	Système vasculaire intrahépatique provenant des Carnets de Leonard de Vinci et illustré par Francis Glisson	26
1.2	Schéma de la structure lobulaire du foie adapté du Textbook of Histology de Bloom et Fawcett	27
1.3	Les fonctions métaboliques du foie	28
1.4	Schéma des trois principales voies métaboliques du foie	29
2.1	La stéatose macrovacuolaire et microvacuolaire	34
2.2	Le mécanisme de l'accumulation d'acides gras dans le foie	36
2.3	La stéatohépatite non-alcoolique	37
2.4	Le taux de prévalence de la stéatose hépatique utilisant différentes méthodes de diagnostic	39
2.5	Le spectrum de maladies liées à la stéatose hépatique	43
2.6	Les modèles génétiques de stéatose hépatique et leur action sur le métabolisme du foie	53
3.1	La phase de priming résumant l'interaction entre les cellules de Kupffer et les hépatocytes déclenchant l'expression des cytokines pro-inflammatoires de la phase de « <i>Priming</i> »	63
3.2	Les principales étapes de la régénération hépatique post hépatectomie	68
4.1	La voie EGFR dans le foie : sources majeures des ligands de l'EGFR ainsi que quatre grandes voies connues comme étant activées en aval	75
5.1	La superfamille du TGF- β représentant les ligands, les récepteurs et les voies activées par chacun d'eux	80
5.2	La signalisation intracellulaire du TGF- β et de BMP	82
6.1	Les voies de signalisation activées par l'hormone de croissance	93
6.2	Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance	95

6.3	Les actions majeures de l'hormone de croissance par l'intermédiaire ou non de l'IGF-1	98
6.4	Modèle proposé du contrôle moléculaire de l'entrée synchrone en phase S des hépatocytes post hépatectomie	115
7.1	Analyse de l'expression d'EGFR sur deux modèles de régime gras	147
7.2	La prolifération hépatocytaire mesurée par BrdU 48h après injection de CCL4	149
7.3	Optimisation du protocole de sauvetage phénotypique par injection d'un vecteur adénoviral	151
7.4	Réexpression de l'EGFR et de la prolifération par injection d'AdGFP+AdrTTA	153
7.5	Western Blot de l'expression de la phosphorylation de PLC- γ .	155
7.6	Analyse de la voie TGF- β au cours de la régénération hépatique chez les animaux stéatosiques comparés aux contrôles . .	156
7.7	Analyse des transcrits du TGF- β	157
8.1	Modèle proposé des voies EGFR et TGF- β au cours de la régénération hépatique	171
9.1	Construction du vecteur adénoviral EGFR. Quatre étapes aboutissent au vecteur adénoviral EGFR	218

Liste des tableaux

2.1	Ensemble des modèles murins de stéatose et stéatohépatite. . .	46
3.1	Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe hépatique	58
3.2	Résumé de l'ensemble des articles consacrés à la recherche sur la régénération du foie en cas de stéatose hépatique sur modèles murins	71

Liste des abbréviations

AGHD	Adult Growth Hormone Deficiency
AOX	Acyl-CoA oxydase
AP-2	Activator Protein
ATP	Adénosine-5'-Triphosphate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Encadrant	M. Jacques-Emmanuel GUIDOTTI
BTC	Betacelluline
CCL4	Carbon tetrachloride
CDK	Cyclin dependent kinase
ChREBP	Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein
CIDE-A	Cell death activator
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-Reactive Protein
DAG	Diacylglycérol
DEN	Diethylnitrosamine
EGF	Epidermal Growth Factor
EPR	Epiréguline
Erks	Extracellular-signal-regulated kinases
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLPC	Fetal Liver Progenitor Cells
Foxm1b	Forkhead Box m1b
FXR	Farnesoid X Receptor
GDF	Growth and Differentiation Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GH	Growth Hormone
GHIH	Growth Hormone Inhibiting Hormone
GHRH	Growth Hormone Releasing hormone
GHRLD	Growth Hormone Receptor Liver Deficient
GLUT4	Glucose Transporter type 4
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HB-EGF	Heparin-Binding EGF
HFCS	High-Fructose Corn Syrup
HFD	High Fat Diet
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HSL	Hormone-Sensitive Lipase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein

IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IGFBP	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 1
IL-6	Interleukin 6
IP3	Inositol triphosphate
IRS	Insulin Receptor Substrate
Jak2	Janus kinase 2
JNKs	c-Jun N-terminal kinases
LAP	Latency Associated Peptide
LDL	Low-Density Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipase
LPS	Lipopolysaccharides
LTBP	Latent TGF- β Binding Proteins
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAT1A	Methionine Adenosyltransferase I
MCD	Methionine Choline Deficient
MIS	Muellerian Inhibiting Substance
MKK4	Mitogen-activated protein Kinase Kinase 4
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NAS	NAFLD Activity Score
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NEMO	NF- κ B-essential-modulator
NF-1	Nuclear Factor-1
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
Nrf1	Nuclear respiratory factor 1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
Pit-1	Pituitary-specific Transcription factor-1
PKC	Protein Kinase C
PLC- γ	Phospholipase C- γ
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
Rb	Retinoblastoma
ROS	Reactive Oxygen Species
RTKs	Receptor Tyrosine Kinase
SAM	S-Adenosyl Methionine
Shc	Src homology 2 domain containing
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOS	Son of Sevenless
Sp1	specificity protein 1
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c
STATs	Signal transducer and activator of transcription
TGF	Transforming Growth Factor
TGR5	G protein-coupled bile acid receptor 1
TNF	Tumor necrosis factor
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
USF	Upstream Stimulating Factor
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein

" Experience teaches only the teachable "

Tragedy and the Whole Truth - **Aldous Huxley** (1931)

Première partie

INTRODUCTION

Chapitre 1

Quelques généralités sur le foie

1.1 Un brin d'histoire

Le foie est l'organe interne le plus volumineux de l'organisme. C'est probablement pour cette raison qu'il a suscité l'intérêt des Hommes depuis plusieurs millénaires. Les babyloniens le considéraient comme le siège de l'âme, de la vie et du sang. A cette époque, les prêtres pratiquaient l'art divinatoire de l'hépatoscopie de foies d'animaux sacrifiés pour y prédire l'avenir. Ceci donna aux babyloniens et plus tard au peuple grec une vision anatomique, quoique superficielle du foie animal [1]. Au III^{ème} siècle avant Jésus-Christ, le médecin grec Hérophile de Chalcédoine pratiqua des vivisections pour parer au tabou de la dissection cadavérique. Il fut le premier à donner une description anatomique précise du foie. Cependant, la description des fonctions hépatiques ne reposait pas tant sur des observations empiriques, puisqu'on le voyait comme à l'origine du sang, une des « quatre humeurs d'Hippocrate » avec la pituite, la bile jaune et noire [2]. Le déséquilibre d'une des humeurs comme celle en provenance du foie était à l'origine des maladies. Si la description anatomique du foie s'est par la suite améliorée avec les dessins du système vasculaire hépatique de Léonard de Vinci, puis plus tard de Francis Glisson en 1654 (Figure 1.1), la connaissance de la fonction du foie n'a pas évolué avant le développement de la chirurgie hépatique, à la fin du XIX^{ème} siècle. On sait à présent que le rôle essentiel du foie est de remplir trois grands groupes de fonctions vitales : métaboliques, de détoxification et d'excrétion.

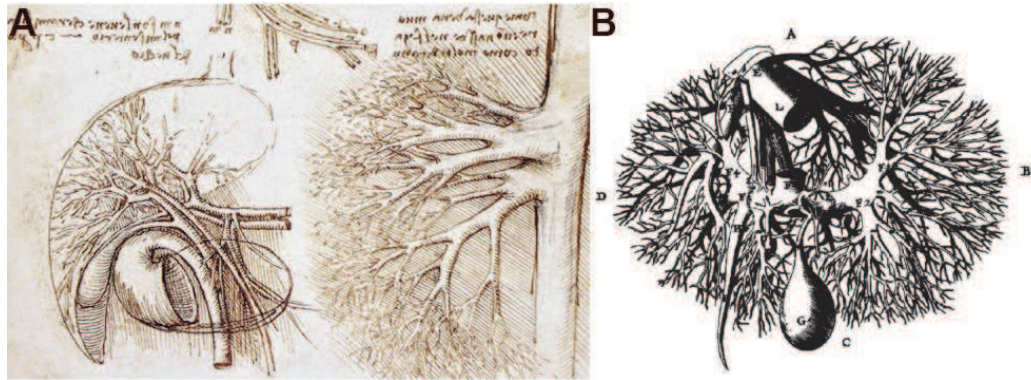


FIGURE 1.1 – Système vasculaire intrahépatique provenant des Carnets de Leonard de Vinci (A) et illustré par Francis Glisson (B) [2]

1.2 Une vision histologique

Anatomiquement, le foie est entouré d'une capsule conjonctive fibreuse nommée la capsule de Glisson entourant les différents lobes qui composent le foie (4 lobes chez l'Homme, 5 chez la souris). Ces derniers ont eux-mêmes été subdivisés en segments de I à VIII par Claude Couinaud en 1954. Cependant, cette séparation anatomique n'a pas de conséquence fonctionnelle sur le foie puisque tous les lobes exécutent les mêmes rôles. En effet, on considère le lobule hépatique comme l'unité fonctionnelle du foie.

1.2.1 Le lobule hépatique

Cette structure hexagonale s'organise autour d'une veine centrolobulaire et est délimitée par plusieurs espaces portes comprenant la veine porte, un canal biliaire et une artère hépatique (Figure 1.2). Le sang véhiculant les nutriments de la digestion intestinale arrive dans le foie par la veine porte, tandis que le sang oxygéné passe par l'artère hépatique. Le tout est ensuite filtré en passant à travers les sinusoides et relargué dans la veine centrolobulaire avant de se jeter dans les veines sus-hépatiques pour y être évacué. Les canalicules biliaires servent quant à eux à récupérer la bile produite par les hépatocytes, qui s'abouchent dans les canaux biliaires, puis le canal cholédoque avant de rejoindre le duodénum.

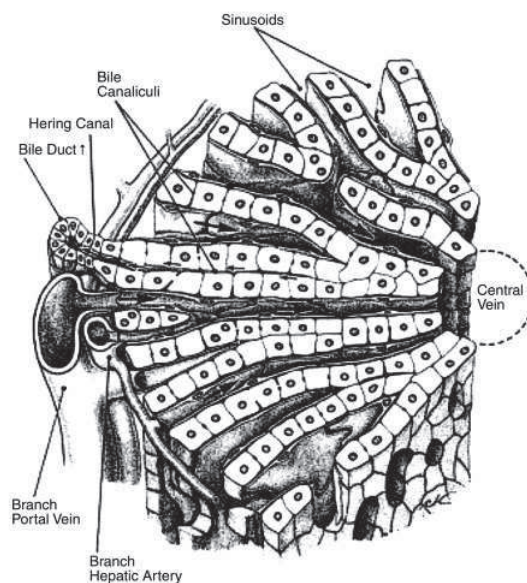


FIGURE 1.2 – Schéma de la structure lobulaire du foie adapté du Textbook of Histology de Bloom et Fawcett [3]

1.2.2 Les types cellulaires

Les hépatocytes représentent 60% des cellules du foie mais comptent pour 80% du volume hépatique. Ces cellules assurent de multiples fonctions métaboliques et pour ce faire, présentent une structure polarisée. La partie basale, proche de la circulation sanguine fait face aux sinusoides, la partie apicale participe à la formation du réseau de canalicules biliaires par accolement de la membrane plasmique avec les autres hépatocytes [4].

Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales du canal biliaire. Elles participent à la formation de la bile en relarguant du bicarbonate et de l'eau, et à son transport vers le canal cholédoque.

Les cellules endothéliales du foie sont des cellules sinusoidales formant les vaisseaux sanguins. Elles sont fenestrées et dépourvues de membranes basales pour faciliter les échanges avec les hépatocytes [5].

Les cellules de Küpffer composent une partie du système immunitaire du foie et se situent dans la lumière des sinusoides. Ce sont les macrophages du foie, ce qui en fait les principaux acteurs du système phagocytaire hépatique. Elles régulent aussi l'inflammation hépatique en sécrétant des cytokines telles que le $\text{TNF-}\alpha$ et l' IL-6 [5].

Les cellules étoilées ou cellules de Ito sont logées dans l'espace péri-sinusoidal situé entre les sinusoides et les hépatocytes. Leur rôle n'est pas

parfaitement caractérisé. On sait qu'elles stockent des gouttelettes lipidiques riches en vitamine A et sont impliquées dans la réparation et dans le développement de la fibrose hépatique en dialoguant avec les cellules immunitaires du foie. Quand le foie présente une lésion, ces cellules vont être responsables du collagène sécrété [5].

1.2.3 Une compréhension fonctionnelle

On dénombre pas moins de 500 fonctions différentes du foie. Pour cette raison, il serait fastidieux de toutes les énumérer mais il est possible de les regrouper par différentes catégories.

La fonction métabolique du foie

Le foie est le premier organe que rencontrent les nutriments après leur absorption. En conséquence, il permet de stocker un certain nombre de vitamines ainsi que le fer, mais il a un rôle prépondérant dans le métabolisme de des hydrates de carbones, des acides gras et des protéines (Figure 1.3).

Métabolisme des hydrates de carbones

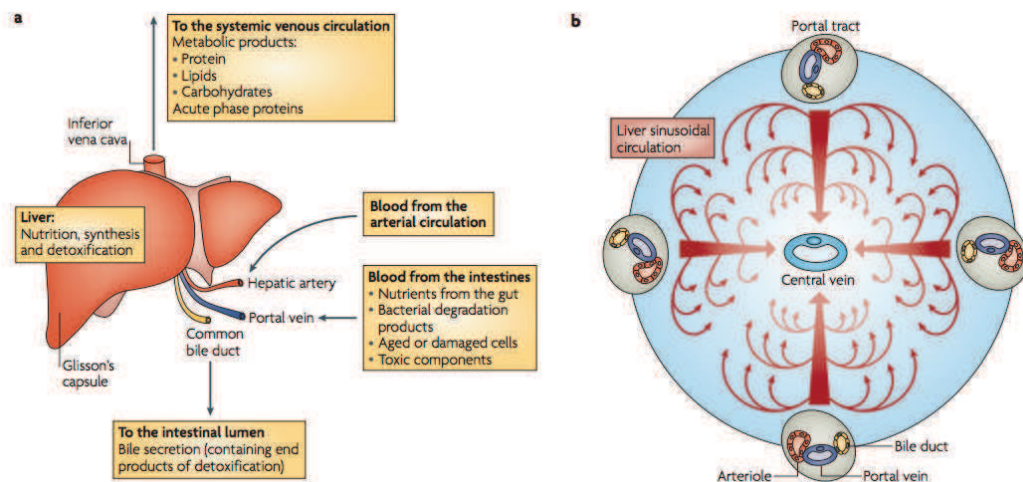


FIGURE 1.3 – Les fonctions métaboliques du foie. (a) les fonctions métaboliques du foie et le flux des produits à travers la veine porte, l'artère hépatique, la veine cave et le canal cholédoque. (b) La microanatomie générale du foie, montrant l'emplacement des veines centrolobulaires, les espaces portes ainsi que le flux sanguin [6]

Le rôle primordial du foie sur les hydrates de carbone est de contrôler la glycémie. Des senseurs intra hépatiques détectent des gradients de concentration de glucose entre la veine porte et l'artère hépatique et réagissent aux sécrétions d'insuline en absorbant le glucose pour le transformer en glucose 6-phosphate dans le foie [7]. Dès lors, il pourra être massivement stocké sous forme de glycogène ou glycolysé pour fournir du pyruvate. Celui-ci entre ensuite dans la mitochondrie et passe par le cycle de Krebs pour fournir l'essentiel de l'énergie dégagée au cours de la glycolyse par une série de phosphorylations oxydatives et produire de l'Acétyl-CoA indispensable à la synthèse lipidique. A l'inverse, lorsque la concentration de glucose est trop faible, sous l'influence du glucagon, le foie peut utiliser ses réserves en glycogène pour former du glucose (glycogénolyse) ou en produire de novo à partir de lactate, d'acides aminés ou de glycérol (néoglucogenèse) [8] (Figure 1.4).

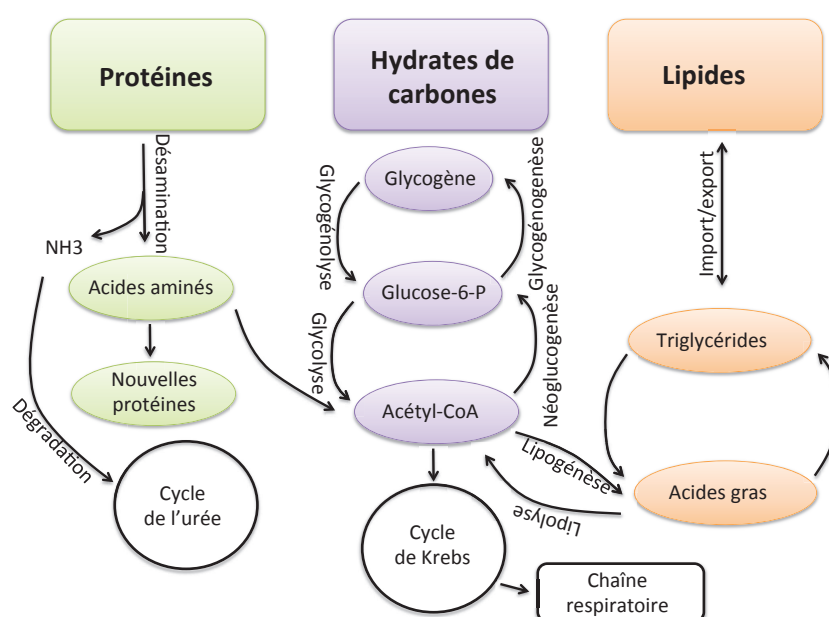


FIGURE 1.4 – Schéma des trois principales voies métaboliques du foie. Le métabolisme protéique, le métabolisme des hydrates de carbones et le métabolisme lipidique

Métabolisme lipidique

Les acides gras arrivant dans le foie sont très vite transformés en triglycérides et peuvent alors emprunter trois voies différentes. Ils peuvent dans un premier temps être utilisés pour produire de l'énergie en agissant comme

substrats à la β -oxydation (lipolyse). Cette réaction les transforme en Acetyl-CoA, qui servira ensuite de carburant pour le cycle de Krebs. Ils peuvent également être exportés à destination des adipocytes grâce à des lipoprotéines (VLDL, IDL, LDL, HDL). Alternativement, ils ont la possibilité d'être stockés dans le foie jouant alors le rôle d'un réservoir de substitution. C'est notamment le cas quand il y a une augmentation de la synthèse ou de l'apport des acides gras et une diminution de la dégradation ou de l'export de ces derniers. Progressivement, ces triglycérides sont stockés de façon excessive sous forme de gouttelettes lipidiques dans le foie. Ceci peut aboutir au développement de la stéatose hépatique qui sera développée dans le chapitre suivant. Le foie peut également produire à la fois son propre cholestérol mais aussi ses triglycérides à partir d'Acétyl-CoA par une réaction appelée lipogénèse [8] (Figure 1.4).

Métabolisme des protéines

Les protéines sont très rapidement dégradées en acides aminés, puis désaminées dans le foie. A l'inverse des lipides ou des glucides, les acides aminés ne peuvent pas être stockés. Ils ont alors une alternative possible dans le foie. Ils peuvent servir à produire de l'énergie en étant dégradés par le cycle de Krebs ou participer à la synthèse d'hormones ou de nouvelles protéines. Celles-ci ne sont pas spécifiques au foie et sont pour la plupart relarguées dans la circulation sanguine. Parmi les principales hormones sécrétées par le foie, on peut citer la thrombopoïétine ainsi que l'insulin-like growth factor (IGF-1). Quant aux protéines, on note en particulier l'albumine, la fibronectine, la transferrine, la céruloplasmine, la C-Reactive Protein (CRP) ou encore certaines protéines pro- et anti-coagulantes. De l'ammoniac se forme à partir de la désamination des protéines, qui doit ensuite être métabolisé sous forme d'urée en passant par le cycle de l'urée [9] (Figure 1.4).

La fonction de détoxification du foie

Le foie est le premier filtre de l'organisme et pour cette raison, il est soumis à un très grand nombre de produits toxiques endogènes et exogènes (xénobiotiques) chaque jour. Il a donc un rôle essentiel de détoxification de l'organisme qui s'effectue au sein même des hépatocytes. Si ces substances toxiques sont hydrosolubles, elles sont facilement éliminées par filtration des reins. En revanche, quand elles sont liposolubles, elles subissent alors une série de transformation pouvant se classer en une phase I d'oxydoréduction, ainsi qu'une phase II de réaction de conjugaison. La première phase a pour objectif d'augmenter la polarité des substrats toxiques catalysés par un ensemble de

cytochrome dont les plus étudiés sont les cytochromes P450 (CYP450) [10]. La deuxième phase consiste ensuite à associer des substances endogènes telles que l'acide glucuronique ou le glutathion, aux métabolites afin d'augmenter leur hydrosolubilité, faciliter ainsi leur évacuation et diminuer d'autant mieux leur toxicité. Ces composés sont ensuite éliminés via la bile ou les urines.

La fonction d'excrétion

Le foie a un véritable rôle de glande mixte, endocrine mais aussi exocrine. En effet, en plus d'excréter quelques hormones ainsi qu'un certain nombre de protéines de coagulation dans la circulation sanguine, le foie produit constamment de la bile. La bile est composée principalement d'eau, de sels biliaires (eux même synthétisés à partir du cholestérol), de bilirubine et de mucus et a pour rôle de faciliter la sécrétion des lipides et des xénobiotiques transformés. La bile passe ensuite dans les canalicules, puis les canaux biliaires avant de se diriger vers la vésicule biliaire, réservoir de stockage, ou le duodénum [11].

Chapitre 2

La stéatose hépatique non alcoolique

2.1 Définition de la stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique non alcoolique est une maladie chronique du foie et la première cause de pathologie hépatique dans les pays développés [12]. Décrite initialement il y a une trentaine d'années chez des patients non alcooliques au Japon, puis aux USA [13], elle a été définie et décrite chez l'Homme pour la première fois par Jurgen Ludwig en 1980 [14]. Il en existe deux formes : la stéatopathie non alcoolique (en anglais NAFLD pour Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) et la stéatohépatite non-alcoolique (en anglais NASH pour Non-Alcoholic SteatoHepatitis). Histologiquement, les lésions hépatiques sont semblables à celles observées dans le cadre de la stéatose hépatique alcoolique, mais elles se définissent par leur apparition alors que la consommation d'alcool est inférieure à 30 g/jour pour les hommes et à 20 g/jour pour les femmes.

On distingue les formes primaires de stéatose hépatique non-alcoolique, associées à l'obésité, au diabète de type II et au syndrome métabolique et les formes secondaires, dès lors qu'elles sont accompagnées d'autres facteurs tels que des pathologies infectieuses, l'usage de médicaments, etc [15]. Cependant, afin de rester dans l'axe du sujet et pour plus de clarté, la suite de ce chapitre se concentrera sur les formes de stéatose hépatique non-alcoolique primaire sans aborder les formes secondaires.

2.1.1 La stéatopathie non-alcoolique

La stéatopathie non-alcoolique ou Non-Alcoholic Fatty Liver Disease se manifeste par l'accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes, amenant alors à la formation de gouttelettes lipidiques, de façon prédominante dans les régions centrolobulaires. En fonction de la taille des vésicules lipidiques intrahépatocytaires, on distingue deux types de stéatose : microvacuolaire, ou macrovacuolaire (Figure 2.1) lorsque les vacuoles dépassent la taille du noyau et repoussent celui-ci en périphérie de la cellule. Il existe plusieurs grades de stéatose la classifiant de I à IV, partant de la présence de gouttelettes lipidiques dans 5% des hépatocytes jusqu'à plus de 75% des hépatocytes.

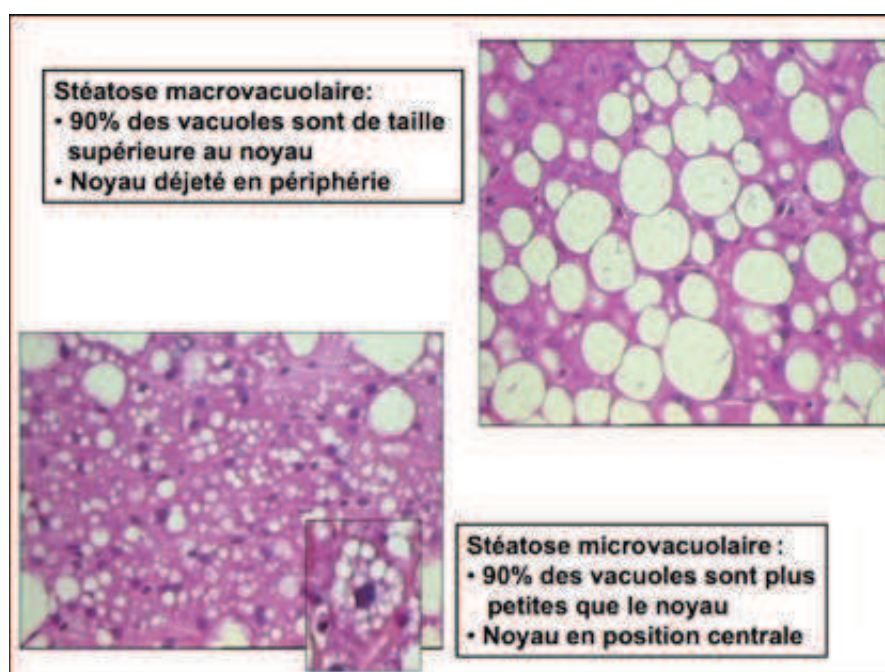


FIGURE 2.1 – La stéatose macrovacuolaire et microvacuolaire [16]

Le développement d'une insulino-résistance est généralement décrit comme étant l'élément pathogène majeur dans l'apparition de la stéatose.

Au niveau du foie, il existe cependant une dissociation du mécanisme de l'insulino-résistance. En effet, l'insuline n'est plus capable de réprimer la production de glucose hépatique, entraînant une néoglucogénèse constante, mais elle continue de stimuler la lipogenèse *de novo* [17]. Pour expliquer cette dichotomie entre le métabolisme glucidique et le métabolisme lipidique, une étude a mis en évidence l'incapacité d'IRS1 à inactiver FOXO1, ce qui conduit

à une néoglucogénèse toujours active. A l'inverse, l'uprégulation d'IRS2 répond toujours au signal insulinique possiblement par l'induction d'AKT2 [17]. Le signal est ensuite médié via des facteurs de transcription bien décrits tels que Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c (SREBP-1c) et Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein (ChREBP) pour induire la lipogénèse *de novo* hépatique.

Au niveau du tissu adipeux, on observe une augmentation de la lipolyse des acides gras, habituellement inhibée par l'action de l'insuline. Ceux-ci sont alors captés massivement par le foie. En principe, les acides gras dans le foie peuvent être soit β -oxydés pour fournir de l'énergie, soit estérifiés pour être stockés sous forme de triglycérides, soit transportés sous forme de lipoprotéines de très basse densité (VLDL pour Very Low Density Lipoproteins). Cependant, l'augmentation de la synthèse et de l'apport des acides gras induit un déséquilibre des balances import/export et synthèse/dégradation. En conséquence, ceci entraîne un stockage important des acides gras sous forme de triglycérides au niveau des hépatocytes conduisant à l'apparition de gouttelettes lipidiques [18] (Figure 2.2). Par ailleurs, une étude a montré que l'essentiel de l'apport en triglycérides associé à la stéatose dans le foie vient de l'apport des acides gras en provenance du tissu adipeux, arrive ensuite l'augmentation de la lipogénèse *de novo*, puis l'alimentation [19].

2.1.2 La stéatohépatite non-alcoolique

La stéatohépatite non-alcoolique ou Non-Alcoholic SteatoHepatitis se définit par la présence d'inflammation en plus de la simple stéatopathie non-alcoolique. Histologiquement, des lésions nécrotico-inflammatoires apparaissent et les hépatocytes se ballonnent [20] (Figure 2.3).

La théorie des « hits »

On décrit souvent la stéatohépatite non-alcoolique comme étant consécutive à la stéatopathie non-alcoolique. En effet, la théorie des « deux hits » décrit ces deux conditions comme une suite séquentielle d'évènements faisant intervenir plusieurs mécanismes. Le premier « hit », se définissant par l'apparition simple de stéatose, induite par l'insulino-résistance, rendant dès lors le foie plus vulnérable à une série de facteurs caractérisant le deuxième « hit ». [21]. La stéatose induit une dérégulation de la β -oxydation au niveau des mitochondries. Les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire sont à l'origine de l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS, qui entraînent ensuite la peroxydation des lipides présents dans le foie et la formation de composés toxiques [22][23]. Ceci initie un processus inflammatoire activant la voie NF κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que

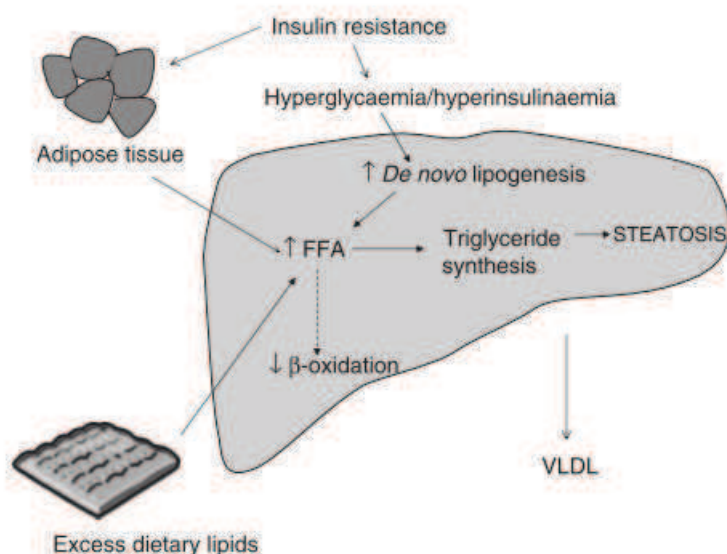


FIGURE 2.2 – Le mécanisme de l’accumulation d’acides gras dans le foie [18]. Les triglycérides sont formés par l’estérification des acides gras libres et du glycérol au sein des hépatocytes. Les acides gras libres proviennent de trois sources distinctes : la lipolyse du tissu adipeux, le régime alimentaire ainsi que la lipogenèse de novo. Les acides gras libres sont ensuite utilisés pour la β -oxydation ou la ré-estérification en triglycérides pour le stockage en gouttelettes lipidiques ou l’export en VLDL. Ainsi, l’accumulation de gras au sein des hépatocytes résulte d’une augmentation de la synthèse ou de l’import, ou encore une diminution de la dégradation ou de l’export des acides gras.

TnF α en provenance des cellules de Kupffer. L’ensemble de ces changements entraîne une hypersensibilisation aux chimiokines et adipokines qui inondent le foie [24].

Plus récemment, plusieurs auteurs ont proposé un modèle un peu plus complexe en « hits multiples » en provenance du tissu adipeux et de l’intestin [25]. Dans ce système, le foie ne parvient alors pas à se protéger de l’ensemble des signaux lipotoxiques, ce qui entraîne une forte inflammation hépatique. Premièrement, des études ont souligné le concept de lipotoxicité qui participent à la mise en place des premiers éléments inflammatoires liés à la stéatose. On sait notamment que certains acides gras libres et le cholestérol sont considérés comme des lipides agressifs, qui entraînent l’activation du TNF- α et la production de ROS [26]. Des lipides contenus dans le régime alimentaire comme les acides gras insaturés (communément appelé « acides gras trans »), ou plus récemment le fructose [27] ont été pointé du

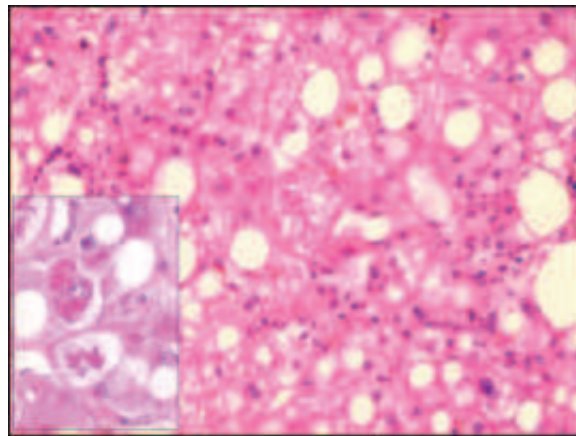


FIGURE 2.3 – La stéatohépatite non-alcoolique [16]. En plus de la stéatose hépatique, les hépatocytes présentent une ballonnisation, et une inflammation y est associée qui se manifeste notamment par la présence de corps de Mallory (encadré)

doigt dans ce phénomène. D'autre part, des signaux en provenance du microbiote intestinal peuvent participer à l'émergence de la stéatohépatite. A titre d'exemple, il a été montré qu'une dérégulation du microbiote intestinal entraîne une métabolisation excessive de la choline en méthylamine [28]. L'absence de choline et notamment les régimes déficients en choline, sont connus pour entraîner une stéatose hépatique et une inflammation associée comme nous le verrons plus loin. Le tissu adipeux joue également un rôle actif dans la stéatohépatite puisque l'accumulation de gras entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires $\text{TNF-}\alpha$ et IL-6 [29]. On a également observé une diminution de l'adiponectine liée à l'obésité dans le tissu adipeux, qui semble importante pour l'activation de Sirt1 [30]. La déficience en Sirt1 entraîne une stéatose hépatique ainsi qu'une inflammation au niveau du foie qui sera abordée plus tard dans ce chapitre. Ainsi, dans ce modèle, un grand nombre de processus se mettent en place en parallèle et participent ensemble à l'émergence de la stéatohépatite.

Ces modèles amènent un certain nombre de questions non résolues notamment du fait de la difficulté d'obtenir de bons modèles de stéatohépatite non-alcoolique en laboratoire. A ce jour, on ne comprend pas pourquoi certains patients avec une stéatopathie non-alcoolique ne développeront jamais d'inflammation associée. On peut par exemple imaginer une plus grande susceptibilité génétique à développer une réaction inflammatoire chez certaines personnes. Ceci a notamment été montré sur des personnes présentant des polymorphismes d'IRS1 [31] ou encore de la Patatine-like phospholipase 3 (PNPLA3) à la fonction inconnue [32]. Cependant, la plupart des démonstra-

tions de cette théorie ont été réalisées sur modèles murins et ne sont appuyées que par des observations cliniques chez l'Homme. Une étude a notamment observé une augmentation de lipides peroxydés sur des biopsies de patients atteints de stéatohépatite non-alcoolique comparés à ceux atteints seulement de stéatopathie non-alcoolique [33].

2.2 L'épidémiologie de la stéatose hépatique

2.2.1 La prévalence

Il est assez difficile d'établir la prévalence exacte de la stéatose dans la population. En effet, celle-ci est habituellement asymptomatique. De plus, les méthodes diagnostiques non invasives ne permettent pas d'être formel. La lecture des transaminases peut quelques fois amener à la découverte d'une stéatose hépatique chez les patients. L'échographie permet également de diagnostiquer la stéatose hépatique avec une très bonne spécificité mais une très faible sensibilité, puisqu'elle ne la détecte qu'au-delà de 30% et d'autant plus difficilement chez les patients obèses [34]. En conséquence, la prévalence de cette maladie est certainement sous-estimée et varie sensiblement selon les sources (Figure 2.4).

Malgré tout, parmi les chiffres à retenir, on avance une prévalence de 30% dans les pays développés [36], variant quelque peu selon les papiers, avec 29% au Japon [37], 25,8% en Espagne [38] ou encore 31% en Israël [39]. Une étude récente a montré que la prévalence de la stéatose a doublé en 20 ans, pour atteindre presque 11% des adolescents américains [40]. Sur la population française, la stéatose évaluée après biopsie hépatique est observée chez un tiers des patients ayant une augmentation des transaminases [41]. La prévalence de la stéatohépatite est évaluée aux alentours de 5% dans la population française.

Il a d'autre part été observé que la stéatose est plus fréquemment détectée chez les hommes, chez les femmes après la ménopause et qu'elle augmente significativement avec l'âge. Des différences ethniques ont aussi été rapportées, on constate par exemple que les Américains d'origine mexicaine semblent plus sensibles au développement de la stéatose, tandis que les Américains d'origine africaine le sont moins [42]. Il s'agit néanmoins pour le moment uniquement d'observations chiffrées et aucune explication moléculaire ou comportementale n'a été apportée pour comprendre ces différences de susceptibilité. Un système de notation (NAFLD Activity Score ou NAS) en fonction de l'histologie du foie a été développé pour définir les différentes étapes de la stéatose hépatique. Ce dernier s'établit en fonction de l'inflammation lobulaire, de la

ballonisation des hépatocytes et du stade de fibrose du foie.

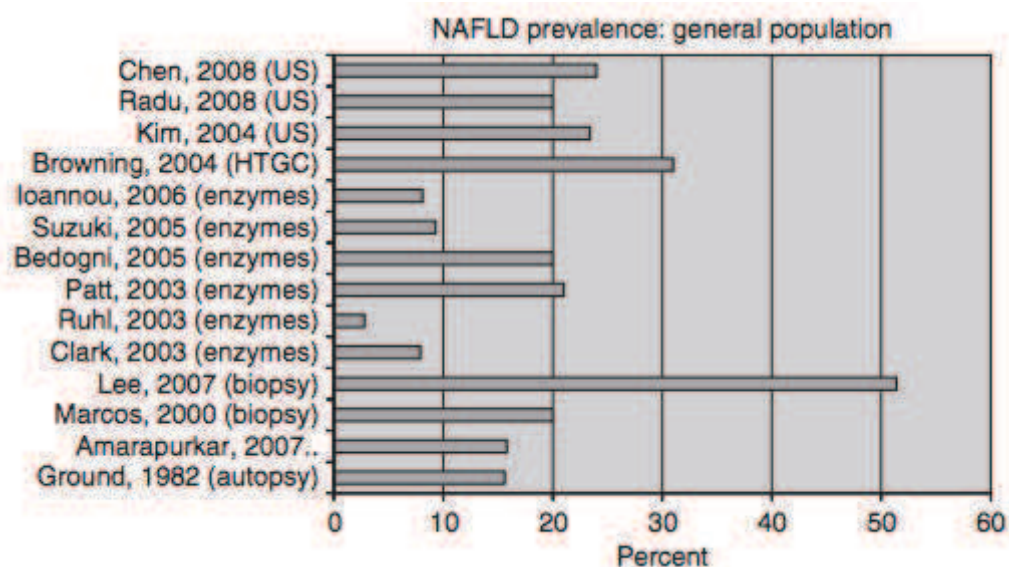


FIGURE 2.4 – Le taux de prévalence de la stéatose hépatique utilisant différentes méthodes de diagnostic [35]

2.2.2 Les facteurs de risque

On observe la stéatose hépatique majoritairement dans les pays développés, mais celle-ci commence à apparaître clairement dans les pays en développement. Ainsi, le style de vie occidental a été fortement souligné comme participant à l'apparition de cette maladie, notamment la sédentarité et les habitudes alimentaires [43]. C'est pourquoi, le fort taux de prévalence de cette maladie et son augmentation croissante ces dernières années, est à mettre en parallèle avec les facteurs de risque qui lui sont associés. L'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type II ainsi que l'hypertriglycémie sont des facteurs impliqués dans le développement de la stéatose hépatique et en augmentation constante dans la population occidentale.

L'obésité

La prévalence de l'obésité, qui se définit classiquement par un IMC¹ supérieur à 30 kg/m², a commencé à croître dès la deuxième moitié du XXe siècle, tant et si bien que l'OMS l'a reconnue comme épidémie mondiale en 1997.

1. Indice de Masse Corporelle ou IMC = poids/taille²

L'environnement a un rôle prépondérant dans cette maladie puisqu'on considère que les facteurs génétiques sont responsables de 25% de la masse grasse [44]. Dans les années 2000, le nombre d'Hommes en surpoids a dépassé le nombre d'Hommes en malnutrition [45]. En 2002, on comptait 33% d'obèses aux Etats-Unis, ou encore 12,4% en France en 2006. Ainsi, il a été montré que 74% des patients subissant une chirurgie bariatrique avaient développé une stéatose hépatique [46] ou encore que la prévalence de celle-ci augmente d'un facteur 4,6 chez les patients obèses [47]. Une autre étude a montré que la prévalence de la stéatose chez des enfants obèses atteignait 53% [48]. De façon intéressante, ces observations montrent par ailleurs que l'obésité morbide ($IMC > 40$) n'est pas systématiquement synonyme de stéatose hépatique.

Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique se définit par une combinaison de dérégulation qui favorise le développement de maladies cardiovasculaires et d'un diabète de type 2. En augmentation depuis plusieurs années, le syndrome métabolique a atteint une prévalence de 25% aux USA [49]. L'IDF² le définit par la présence de l'obésité tronculaire³ comme critère obligatoire accompagnée de la présence d'au moins deux paramètres secondaires, tels qu'une hypertriglycéridémie⁴, un taux de HDL-cholestérol faible⁵, une hypertension⁶ ou une hyperglycémie⁷. La stéatose hépatique est d'ailleurs aujourd'hui considérée comme une manifestation hépatique du syndrome métabolique. En effet, plusieurs études ont montré la présence quasi systématique de marqueurs du syndrome métabolique parmi des patients atteints de stéatose hépatique [50][51].

Le diabète de type II

Le diabète de type II est un désordre métabolique qui se manifeste par une hyperglycémie⁸, induisant des lésions angiopathiques, dans un contexte d'insulino-resistance. En France, on estime aujourd'hui que 2,5 millions de personnes sont traitées pour ce type de diabète et ce nombre est en augmentation constante [44]. Le régime alimentaire occidental joue un rôle majeur

2. International Diabete Federation

3. Périmètre abdominal ≥ 102 cm pour les hommes ou ≥ 88 cm pour les femmes

4. $\geq 1,50$ g/l (1,7mmol/l) ou un traitement spécifique pour cette anomalie lipidique

5. $< 0,40$ g/l (1,0mmol/l) pour les hommes ou $< 0,50$ g/l (1,3mmol/l) pour les femmes

6. Pression artérielle systolique ≥ 130 mm Hg ou diastolique ≥ 85 mm Hg ou une hypertension traitée

7. $\geq 1,0$ g/l (5,6 mmol/l) ou diabète de type II traité

8. $\geq 1,26$ g/l selon l'OMS

dans le développement du diabète de type II en favorisant l'apparition d'une insulino-résistance au niveau des muscles, du foie et du tissu adipeux. Dès lors, le foie commence à relarguer du glucose dans le sang de façon continue et la lipolyse s'accroît dans le tissu adipeux. En hausse continue dans la population comme la majorité des désordres métaboliques, on estime qu'il y a 285 millions de personnes touchées par le diabète de type II, soit 6% de la population mondiale [52]. Encore une fois, la prévalence de la stéatose hépatique sur des patients diabétiques de type II est de 70% [53].

L'hypertriglycémie

L'hypertriglycémie correspond à un taux de triglycérides dans le sang trop élevé⁹. Elle est souvent associée à une hypercholestérolémie mais peut se manifester en absence d'autres dérégulations, on parle alors d'hypertriglycémie pure. Son origine peut être génétique, liée à un mode de vie occidentale, ou à une consommation excessive d'alcool. L'hypertriglycémie augmente les risques de maladies cardio-vasculaires, par dépôts d'athérome dans les artères. La prévalence de l'hypertriglycémie, pure ou associée à d'autres dérégulations, n'est pas connue, mais il a été montré qu'elle augmente les risques de développer une stéatose hépatique de 50% -détectée par échographie- [54].

2.3 Une porte d'entrée vers d'autres pathologies

La stéatopathie non-alcoolique n'est que la première manifestation d'un ensemble de désordres métaboliques au niveau du foie impliquant différents degrés d'inflammation, mais pouvant également faire intervenir de la fibrose, de la cirrhose et pouvant aboutir au carcinome hépatocellulaire. Jusqu'à récemment, l'étiopathogénie de ces maladies n'était pas connue et seul le diagnostic clinique les définissait. Des classifications ont donc vu le jour pour différencier chaque pathologie et les ordonner selon leur sévérité pathologique. L'équipe de McCollough définit par exemple quatre types de stéatopathies en fonction de la présence ou non d'inflammation lobulaire, de ballonnement des hépatocytes, de corps de Mallory ou enfin de fibrose [55]. Malgré tout, l'ensemble des systèmes de classification ainsi que la variabilité de diagnostics

9. $\geq 1,50\text{g/l}$ ($1,7\text{mmol/l}$)

liée à l'anatomo-pathologiste et au manque de reproductibilité de la biopsie rendent l'approche de ces maladies et de leur évolution souvent complexe.

Par la suite, plusieurs travaux ont permis d'établir plus clairement l'aspect progressif de la stéatopathie non-alcoolique. En suivant différentes cohortes de patients, il est montré que la maladie passe alors par différents stades d'inflammation et de fibrose, augmentant fortement sa probabilité de progresser vers une cirrhose, une insuffisance hépatocellulaire [56] ou encore un carcinome hépatocellulaire [57]. D'après une autre étude, 31,8% des patients avec une stéatohépatite se sont vus diagnostiqués une fibrose trois ans après [58], 22,3% de patients ont déclaré une cirrhose [59] ou encore 27% des patients présentant une cirrhose ont par la suite développé un carcinome hépatocellulaire [60]. Pour alimenter ces observations, des modèles murins ont montré l'importance des dysfonctionnements au niveau des mitochondries [33], de l'activation des cellules étoilées [61] et des blessures micro vasculaires [62] dans la transition vers la fibrose. Ces études laissent apparaître clairement la notion que la stéatohépatite non-alcoolique peut être un facteur étiologique menant vers d'autres pathologies, autrement plus graves (Figure 2.5).

L'intérêt de parvenir à un consensus de classification de l'ensemble de ces maladies est apparu alors nécessaire. C'est ce qu'a entrepris une étude se concentrant sur certains aspects de l'avancement de la stéatose hépatique portant sur les corps de Mallory ou la fibrose. Ces travaux permettent d'insister une fois de plus sur l'importance du bon diagnostic du niveau d'inflammation, pièce maîtresse dans le processus d'évolution de ces maladies [64]. Finalement, un comité de recherche clinique du NIH sur la stéatopathie non-alcoolique (NASH-CRN) a tenté de répondre à l'ensemble des problèmes de reproductibilité diagnostique. En analysant en détail les biopsies de 50 patients, il en a établi une classification très précise composée de 14 « scores » différents [20].

Ainsi, la vision de l'évolution de cette maladie est restée linéaire pendant un certain temps. La stéatose hépatique peut éventuellement être amenée à progresser par les différents stades de la maladie pour se développer en fibrose, cirrhose ou encore carcinome hépatocellulaire. Plus récemment, une équipe française a observé le développement de carcinomes hépatocellulaires sur des patients souffrant de syndrome métabolique, mais sans fibrose apparente [65]. Cette étude a, pour la première fois, montré que la stéatose hépatique et donc le syndrome métabolique pouvaient être des facteurs de risque uniques pour le développement de carcinomes hépatocellulaires. La démonstration sur modèles murins de ce phénomène est intervenue un an plus tard, montrant le développement de carcinomes hépatocellulaires sur des modèles d'obésité génétiques et induites par des régimes [66]. Ainsi, même si plusieurs études soulignaient déjà l'importance de l'obésité comme facteur de

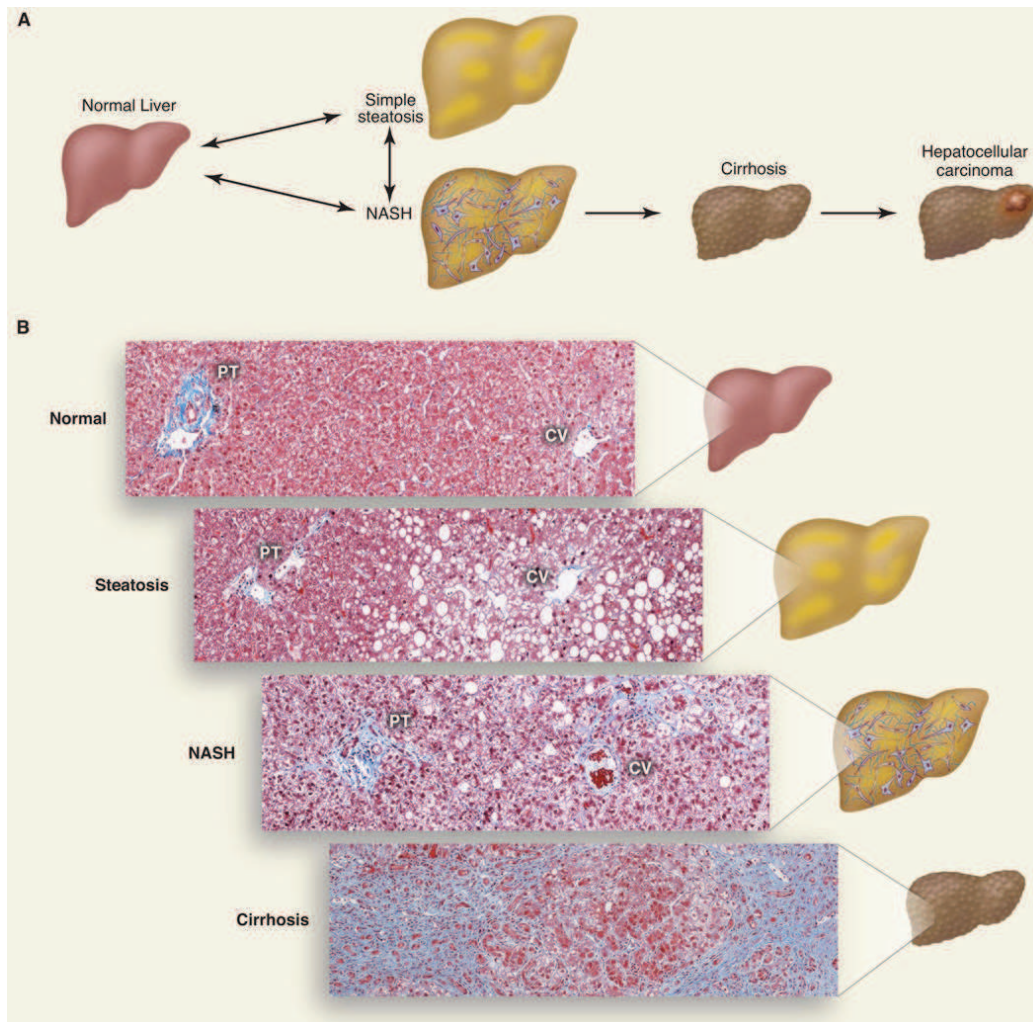


FIGURE 2.5 – Le spectre de maladies liées à la stéatose hépatique [63]. (A) L'accumulation de triglycérides au sein des hépatocytes crée la stéatose. La stéatose liée à de l'inflammation, de la mort cellulaire et de la fibrose est appelée stéato-hépatite non-alcoolique, qui peut ensuite progresser vers la cirrhose. Les individus cirrhotiques ont un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire. (B) Les coupes histologiques illustrent un foie sain, stéatosique, une stéato-hépatite et un foie cirrhotique. Les fibres de collagène sont marquées au bleu par le Trichome de Masson.

risque dans le développement de nombreux cancers [67] et associaient également obésité et cancer du foie [68], beaucoup de travaux récents ont permis de montrer clairement qu'un cancer du foie peut intervenir seulement en présence de stéatose hépatique, indépendamment de toute fibrose. L'ensemble de ces éléments donne à la stéatose hépatique, pourtant bénigne, un tout autre pronostic, en la plaçant comme un facteur de risque important dans le développement de différentes maladies.

2.4 Les modèles murins

Les recherches autour de la stéatose hépatique sur l'Homme présentent évidemment de nombreuses limitations, dont on peut s'affranchir en utilisant des modèles murins. Il existe ensuite deux approches différentes. L'une d'elles consiste à reconstituer la pathologie assez fidèlement sur l'animal en reproduisant la même étiopathogénie, tandis que l'autre consiste à choisir son modèle selon le sujet d'étude. Dans le premier cas, il s'agit de reproduire l'ensemble des facteurs (régime occidental, sédentarité etc.) induisant la stéatose hépatique et visant à recréer exactement le même phénotype au niveau du foie que celui observé chez l'Homme. Il s'agit là d'une difficulté majeure rencontrée dans ce type d'études puisqu'aujourd'hui, aucun modèle animal ne permet de reproduire fidèlement la stéatose hépatique humaine sur un modèle murin, aussi bien au niveau des agents causaux que des composantes histopathologiques. En conséquence, un certain nombre d'études favorisent la deuxième démarche et déterminent la pertinence d'un modèle murin en fonction de la thématique de recherche.

Il existe de nombreux modèles animaux de stéatose hépatique. On peut tout d'abord commencer à distinguer les modèles génétiques et alimentaires. Il existe de nombreux modèles génétiques, destinés à étudier la stéatose hépatique ou ayant initialement une toute autre fonction et dont la stéatose se révèle être une conséquence. L'essentiel des modèles génétiques joue sur des gènes impliqués dans la β -oxydation, la glycolyse, la glycogénolyse, la lipogenèse ou encore le transport des acides gras. On note également la voie des estrogènes qui a été montrée comme jouant sur les sécrétions d'hormone de croissance (cf plus loin). De nombreux gènes impliqués dans le métabolisme hépatique peuvent potentiellement conduire à une stéatose du foie. Pour cette raison, donner une description exhaustive de tous ces modèles est un graal impossible à atteindre et probablement inutile puisque très peu sont véritablement utilisés en tant que modèle de stéatose hépatique ou stéatohépatite par la communauté scientifique. D'autres façons de trier les modèles consistent à les séparer en fonction de la pathogénèse de la maladie, ou en-

core à les classer selon le stade histopathologique du développement de la maladie. Dans la Table 2.1 les modèles de stéatose simple ont été distingués des modèles pouvant aboutir à la stéatohépatite.

2.4.1 Les modèles de stéatose hépatique

Les modèles génétiques

Le modèle ob/ob

Le modèle *ob/ob* est un des plus anciens utilisé en laboratoire. Il est apparu par mutation spontanée en croisant des souches de souris entre elles dans les années 50 [69]. Ces souris hyperphagiques présentent une obésité importante dès six semaines de vie ainsi qu'une inactivité, une hyperglycémie, une insulino-résistance, une hyperinsulinémie et une très forte stéatose hépatique. Il s'agit certainement du modèle murin d'obésité le plus étudié bien que la mutation du gène pour la leptine ne soit pas très fréquente chez les patients obèses.

L'augmentation de la masse adipeuse chez ces souris provoque une élévation du niveau de $\text{TNF}\alpha$, stimulant la lipolyse des acides gras des tissus adipeux qui inondent alors le foie. Ceci accélère d'autant plus la mise en place de la stéatose hépatique chez ces souris. Parmi les dérégulations trouvées au niveau du foie, il a été observé une surexpression de SREBP-1c, qui accentue la lipogenèse de novo des acides gras [70], ou encore certains ont noté une augmentation de la β -oxydation [71] alors que d'autres la conteste [72]. Ces différentes études illustrent en tout cas la dérégulation d'un certain nombre d'enzymes responsables du métabolisme chez les souris *ob/ob*.

Le modèle *ob/ob* n'évolue pas spontanément vers la stéatohépatite. Celle-ci pourra néanmoins être déclenchée par un facteur additionnel pourvoyeur d'inflammation, comme un régime fructose, l'injection de LPS, de Diethylnitrosamine (DEN) ou encore d'éthanol. Bien que ce modèle affiche de nombreuses divergences avec la stéatose observée chez l'Homme, il a l'avantage d'être un modèle génétique qui n'interfère pas avec les gènes codants pour le métabolisme lipidique ou glucidique du foie, ainsi que de présenter un phénotype très marqué et d'afficher les caractéristiques histologiques d'une stéatose vacuolaire prononcée.

Le modèle Db/Db

Le modèle DB/DB a été découvert de façon similaire quelques années plus tard [73]. Les souris présentent un phénotype proche du modèle *ob/ob* avec une obésité marquée, une insulino-résistance, une stéatose hépatique et également un diabète. Contrairement au modèle *ob/ob*, les souris DB/DB ont

Modèle	Origine	Mécanisme	Balance lipidique	Obèse	IR
<i>Modèles de stéatose hépatique</i>					
<i>ob/ob</i>	génétique	hyperphagie	↑ import/synthèse	oui	oui
<i>Db/Db</i>	génétique	hyperphagie	↑ import/synthèse	oui	oui
rat Zucker	génétique	hyperphagie	↑ import/synthèse	oui	oui
<i>KK-Ay</i>	génétique	hyperphagie	↑ import/synthèse	oui	non
<i>PPARα</i>	génétique	β -oxydation	↓ export/dégradation	non	non
<i>MAT1A</i>	génétique	β -oxydation	↓ export/dégradation	non	non
<i>AOX</i>	génétique	β -oxydation	↓ export/dégradation	non	non
<i>Sirt6</i>	génétique	glycolyse	↑ import/synthèse	non	oui
<i>ChREBP</i>	génétique	glycolyse	↑ import/synthèse	non	non
<i>GHRLD</i>	génétique	–	–	non	–
<i>STAT5</i>	génétique	–	–	non	–
<i>CD36-/-</i>	génétique	transport	↑ import/synthèse	non	non
<i>JVS</i>	génétique	β -oxydation	↑ import/synthèse	non	non
<i>Cyp19-/-</i>	génétique	oestrogènes	↓ export/dégradation	oui	non
Tamoxifen	alimentaire	hyperlipidique	↑ import/synthèse	oui	oui
<i>Modèles évoluant vers la stéatohépatite</i>					
<i>SREBP-1c</i>	génétique	lipogénèse	↑ import/synthèse	non	oui
<i>PTEN</i>	génétique	lipogénèse	–	non	non
<i>MTP-/-</i>	génétique	Cycle de Krebs	↓ export/dégradation	?	oui
<i>Nrf1</i>	génétique	glycolyse ?	↑ import/synthèse ?	non	?
<i>NEMO</i>	génétique	glycogénolyse ?	↑ import/synthèse ?	non	non
Fructose	alimentaire	hyperglucidique ?	↑ import/synthèse ?	non	non ?
Cholesterol	alimentaire	hyperlipidique	↑ import/synthèse	non	non
Cholic Ac.	alimentaire	hyperlipidique	↑ import/synthèse	non	non
MCD	alimentaire	β -oxydation	↓ export/dégradation	non	foie

TABLE 2.1 – Ensemble des modèles murins de stéatose et stéatohépatite.

un niveau normal ou élevé de leptine mais sont résistantes à sa sécrétion. Il s'agit néanmoins de deux modèles de stéatose hépatique qui n'évoluent pas spontanément en stéatohépatite ou fibrose.

Le modèle KK-A^y

Ce modèle de souris provient d'une mutation ayant des conséquences directes sur l'expression du gène agouti (KK-A^y/a). Ces souris sont porteuses à la fois d'un allèle « viable yellow » (A^{vy}) et « lethal yellow » (A^y), ce dernier entraînant l'expression ubiquitaire d'ARNm chimériques codant pour la protéine agouti, sans que l'on parvienne exactement à en définir la cause. La protéine agouti agit ensuite comme un agoniste inverse du récepteur de la mélanocortine, qui, en plus de répondre à la sécrétion de mélanocortine, montre également un contrôle sur le métabolisme et le poids des animaux [74]. En conséquence, les souris présentent un pelage jaune ainsi qu'une obésité marquée due à un comportement hyperphagique. Ce modèle va très rapidement développer une insulino-résistance ainsi qu'une stéatose hépatique marquée mais qui ne se développera pas spontanément en stéatohépatite.

Le modèle PPAR- α

Le gène Peroxysome Proliferator-Activated Receptor- α (PPAR- α) code pour un facteur de transcription dont la fonction principale est de réguler le métabolisme lipidique au niveau du foie. Il s'active en particulier en réponse au jeûne en activant un certain nombre de gènes responsables du catabolisme des acides gras. Ainsi, le modèle de souris délété pour PPAR- α n'induit pas de lui-même une stéatose hépatique. Par contre, quand on couple ce modèle à un régime hyperlipidique (cf plus loin) on observe alors la mise en place d'une stéatose hépatique bien plus rapide et forte que leurs contrôles respectifs. Sans que l'on puisse véritablement l'expliquer, il a été observé que ces souris mises à l'état de jeûne développent également une stéatose hépatique [75].

Le modèle MAT1A

La Méthionine AdenosylTransférase-1A (MAT1A) catalyse la formation de S-adénosylméthionine (SAM) à partir de méthionine et d'ATP. Ce métabolite est ensuite responsable de l'ajout de groupement méthyles par des enzymes SAM-dépendantes ou encore de la méthylation de l'ADN. Il a été observé que les souris dépourvues en MAT1A ont un niveau réduit d'antioxydant et présentent également une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras. A huit mois d'âge, ces souris développent spontanément une stéatose hépatique et une hyperglycémie sans présenter aucune autre manifestation du syndrome métabolique. Elles montrent par ailleurs une prolifération hépatocytaire accrue et un développement tu-

moral [76].

Le modèle AOX

L'Acyl-CoA oxydase (AOX) est l'enzyme limitante de l'oxydation des acides gras à longues chaînes au sein des peroxyosomes. En conséquence, les souris mutées pour ce gène accumulent les acides gras à longues chaînes au niveau du foie induisant la formation d'une stéatose hépatique dès 7 jours de vie. Plus tard, le modèle s'accompagne d'inflammation ainsi que d'une augmentation du stress oxydant [77].

Le modèle Sirt6

Les Sirtuines sont une classe d'enzyme de désacétylases d'histone NAD-dépendantes, qui ont récemment été impliquées dans de nombreux processus comme la réparation de l'ADN, l'adaptation à la restriction calorique, le métabolisme de certains organes, les maladies liées au vieillissement ou encore la tumorigénèse. La délétion spécifique de Sirt6 au niveau du foie a révélé une stéatose chez 40% des animaux à 5 mois et 90% à 13 mois, liée à une augmentation de la synthèse des triglycérides. Sirt6 se lie et désacétyle des histones présents sur régions promotrices de gènes impliquées dans la glycolyse. Il semblerait également que Sirt6 ait un rôle positif dans la β -oxydation [78].

Le modèle Sirt1

La délétion spécifique de Sirt1 au niveau du foie induit une stéatose hépatique chez 30% des animaux à 2 mois et jusqu'à 78% des animaux après un an et s'accompagne d'une augmentation de ChREBP [79]. Sirt1 a été montré comme formant un complexe avec Nrf1 impliqué dans une voie de signalisation amenant à la transcription de la glucose-6-phosphatase [80]. Cette mutation amène une surproduction de glucose hépatique, une hyperglycémie chronique ainsi qu'une augmentation de la production de ROS. En conséquence, le stress oxydatif dérégule la signalisation mTorc2/AKT, et conduit à l'installation d'une insulino-résistance. Un traitement antioxydant comme la N-acetyl-L-cystéine (NAC) ou le resveratrol, polyphénol contenu notamment dans le raisin, permet d'améliorer notablement le phénotype.

Le modèle ChREBP

La surexpression par injection d'adénovirus ChREBP chez la souris entraîne une accumulation de triglycérides dans le foie ainsi qu'une hépatomégalie [81]. Il avait par ailleurs été montré que l'inhibition de ChREBP chez les souris *ob/ob* permettait de corriger leur phénotype de stéatose hépatique [82]. De plus, il a été observé une induction de ChREBP chez les souris mutées

pour Sirt1 [79] ainsi que chez des patients présentant plus de 50% de stéatose [81]. ChREBP présente un rôle essentiel dans le contrôle de la balance lipidique puisqu'il agit, sous le contrôle du glucose, en stimulant la glycolyse par activation la L-pyruvate kinase.

Le modèle GHRLD, Jak2 et STAT5

La voie de l'hormone de croissance (GH) a elle aussi un rôle dans le contrôle des triglycérides hépatiques. L'hormone de croissance est connue pour avoir un effet lipolytique sur le tissu adipeux ainsi que pour augmenter la sécrétion des triglycérides du foie. La délétion spécifique du récepteur de l'hormone de croissance dans le foie (GHRLD) entraîne une stéatose hépatique en corrélation avec une diminution de la sécrétion de triglycérides [83]. La délétion de Jak2 ou de STAT5 hépatique, directement en aval de l'hormone de croissance dans le foie, conduit à un phénotype similaire [84].

On peut par ailleurs noter que les estrogènes contrôlent la voie de l'hormone de croissance, ce qui explique une partie du dimorphisme sexuel associé à l'hormone de croissance. C'est probablement la raison pour laquelle d'autres modèles de souris jouant sur des inhibitions de la voie des estrogènes comme la mutation *Cyp19*^{-/-} (femelles ne produisant pas d'œstrogène) ou encore l'injection de tamoxifène (antagoniste de l'œstrogène) induisent également un phénotype de stéatose hépatique.

Les modèles induits par des régimes

Le(s) modèle(s) High Fat Diet

Le modèle High Fat Diet (HFD) est un modèle de souris induit par un régime gras. Le principe de ce modèle repose sur l'idée de vouloir reproduire assez fidèlement notre régime alimentaire, puisqu'il représente une des causes majeures de l'obésité humaine dans le monde occidental. En jouant sur l'apport des lipides et glucides par rapport aux protéines, on va ainsi pouvoir observer l'apparition d'une obésité, d'une insulino-résistance et d'un diabète. Il existe cependant une multitude de régimes HFD jouant différemment sur les formules caloriques sans qu'aucun consensus de régime HFD ne soit établi. En conséquence, les modèles HFD sont très utilisés par les scientifiques mais amènent parfois à des résultats contradictoires en fonction du régime choisi, de la souche de souris ou de rat utilisée et la durée du régime. Beaucoup induisent la mise en place d'une obésité et d'une stéatose hépatique. D'autres vont s'accompagner d'inflammation et amener au développement d'une stéatohépatite [85]. Pour essayer de pallier la variabilité de ces modèles, ou encore pour augmenter le phénotype de stéatose ou stéatohépatite,

certains les combinent avec d'autres régimes, comme l'administration de fructose [86] ou encore d'aurothioglucoose [87].

2.4.2 Les modèles de stéatohépatite

Les modèles génétiques

Le modèle SREBP-1c

Les souris SREBP-1c sont à l'origine d'un modèle de lipodystrophie congénitale [88]. Ce modèle présente une surexpression dans le tissu adipeux du facteur de transcription Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c (SREBP-1c) ayant une action lipogénique. En parallèle d'un défaut de différenciation des adipocytes, ces souris présentent une insulino-résistance, un diabète ainsi qu'une stéatose hépatique dès 8 jours de vie. Progressivement, ce modèle va évoluer vers une stéatohépatite en développant une inflammation lobulaire, une ballonnisation des hépatocytes et plus tard une fibrose hépatique aux alentours de 20 semaines.

Le modèle PTEN

Le modèle *Phosphatase and TENsin homologue* (PTEN) muté spécifiquement au niveau du foie a été initialement présenté comme un outil pour observer les différentes actions métaboliques de l'insuline. En effet, PTEN est un régulateur négatif de la voie de signalisation phosphatidylinositol kinase 3/serine thréonine kinase AKT (PI3K/AKT), qui représente le principal médiateur hépatique de la voie de l'insuline via son récepteur. La voie PI3K/AKT agit néanmoins sur d'autres signaux, notamment sur l'apoptose, la prolifération cellulaire ainsi que la formation de tumeurs. Ainsi, la délétion spécifique de PTEN au niveau du foie induit une synthèse des acides gras, une hépatomégalie, une hypersensibilité à l'insuline ainsi qu'une stéatose hépatique dès l'âge de 10 semaines [89]. Aux alentours de 40 semaines, on note l'apparition de fibrose hépatique puis plus tard d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires [90].

Le modèle NEMO

NF- κ B-essential-modulator (NEMO/IKK γ) est un médiateur de l'activation de NF- κ B. Sa délétion dans les cellules du parenchyme hépatique entraîne l'apparition de carcinomes hépatocellulaires. De façon intéressante, ces tumeurs sont précédées par une séquence semblable aux désordres métaboliques associés à la stéatopathie non-alcoolique chez l'Homme et menant au carcinome hépatocellulaire (NASH, fibrose) [91]. Le modèle NEMO est

le seul à reproduire l'évolution de la stéatose hépatique dans son intégralité ainsi que la pathogénèse du carcinome hépatocellulaire. Il reste cependant davantage un modèle pour étudier la mise en place de ces tumeurs dans le foie qu'un modèle de stéatohépatite stricte. Cette étude met en avant un rôle suppresseur de tumeur de NEMO ainsi qu'un potentiel rôle dans la glycogénolyse amenant à l'accumulation de gras dans les hépatocytes [91].

Le modèle PDGF-C

Il est à noter qu'il existe également un modèle d'induction par vecteur adénoviral de Platelet-Derived Growth Factor C (PDGF-C) qui conduit à une fibrose, une stéatose hépatique ainsi qu'au carcinome hépatocellulaire mais dont la mise en place ne respecte pas la séquence habituellement observée dans la maladie [92]. Bien que l'on observe différents stades de la maladie dans ce cas, il s'agit davantage d'un modèle de fibrose que de stéatose hépatique.

Les modèles induits par des régimes

Le(s) modèle(s) fructose

L'utilisation du fructose comme modèle de stéatose hépatique s'est accentuée après un certain nombre d'études montrant la corrélation entre l'augmentation de l'obésité et la consommation de fructose [93]. En effet, le fructose est largement utilisé dans nos régimes occidentaux, particulièrement en Amérique du Nord (régime « fast food »). Son pouvoir sucrant de 20 à 40 fois supérieur au saccharose en fait le sucre de prédilection dans l'industrie agroalimentaire, qui l'utilise sous forme de sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS). Or, il a été montré que la consommation de fructose à elle seule pouvait induire une stéatose hépatique [94]. L'utilisation du fructose sur modèles murins induit des phénotypes très variables en fonction de la concentration en fructose, de la durée du régime ou de l'association avec un autre modèle comme le HFD. De façon générale, cinq semaines de régime fructose sont capable d'induire une stéatohépatite [95].

Le modèle de régime cholestérol et d'acide cholique

Le régime athérogène composé de 1,25% de cholestérol et de 0,5% d'acide cholique était initialement utilisé pour étudier l'athérosclérose en raison des lésions vasculaires qu'il entraînait. Plus récemment, une forte induction de la stéatose hépatique, de l'inflammation ainsi que de la fibrose a été observée après 24 semaines. Ce régime entraîne cependant une insulino-sensibilité ainsi qu'une perte de poids par rapport aux contrôles [96].

Le modèle Methionine Choline Deficient

Le modèle Méthionine Choline Deficient (MCD) est basé sur un régime alimentaire à 40% de sucrose et 10% de lipides mais dépourvu de méthionine et de choline. La choline est essentielle à la formation de particules de phosphatidylcholines. De par ses propriétés à la fois hydrophiles et lipophiles, la phosphatidylcholine participe au transport des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Ainsi, il a longtemps été établi que l'absence de choline entraînait une réduction de l'export des acides gras qui se retrouvent stockés au niveau du foie générant une stéatose hépatique [97]. Cette explication a récemment été remise en question et certains auteurs suggèrent de revisiter la mécanistique induite par l'absence de choline pour correctement définir son rôle [98]. La méthionine a un rôle important sur la méthylation de l'ADN et sur la synthèse de glutathion. Au niveau du foie, son absence amène à une diminution des concentrations de glutathion, entraînant ainsi des dommages oxydatifs abîmant le tissu hépatique et qui aboutissent très rapidement à la formation de stéatose hépatique, puis à une stéatohépatite [99]. Le modèle MCD entraîne également une réduction de la β -oxydation mitochondriale et induit l'expression de CYP2E1 [100]. Ce modèle est donc progressivement responsable d'une stéatose, d'une stéatohépatite et éventuellement d'une fibrose hépatique.

Bien que ce modèle ne développe pas d'insulino-résistance, présente une distribution d'acides gras plutôt périveineuse -contrairement à l'Homme- et entraîne une perte de poids chez l'animal [101], il a l'avantage de reproduire fidèlement les différents stades de la maladie observée chez l'Homme d'un point de vue histopathologique [97]. Par ailleurs, c'est un des meilleurs modèles pour induire une forte production de ROS, des altérations de l'ADN mitochondrial et pour induire l'apoptose des cellules hépatiques ; autant de caractéristiques retrouvées dans la stéatohépatite chez l'Homme [102]. En résumé, si son utilisation pour étudier la pathogénèse de la maladie est discutable en raison de l'étiologie de la stéatose et de l'amaigrissement des animaux, c'est en revanche un bon modèle pour étudier la progression de la maladie de la stéatose hépatique vers la stéatohépatite et ses conséquences sur les différentes fonctions du foie.

Pour plus de lisibilité entre l'ensemble de ces modèles, la majorité de ceux-ci et leur action sur le métabolisme du foie sont résumés dans la Figure 2.6 ci dessous.

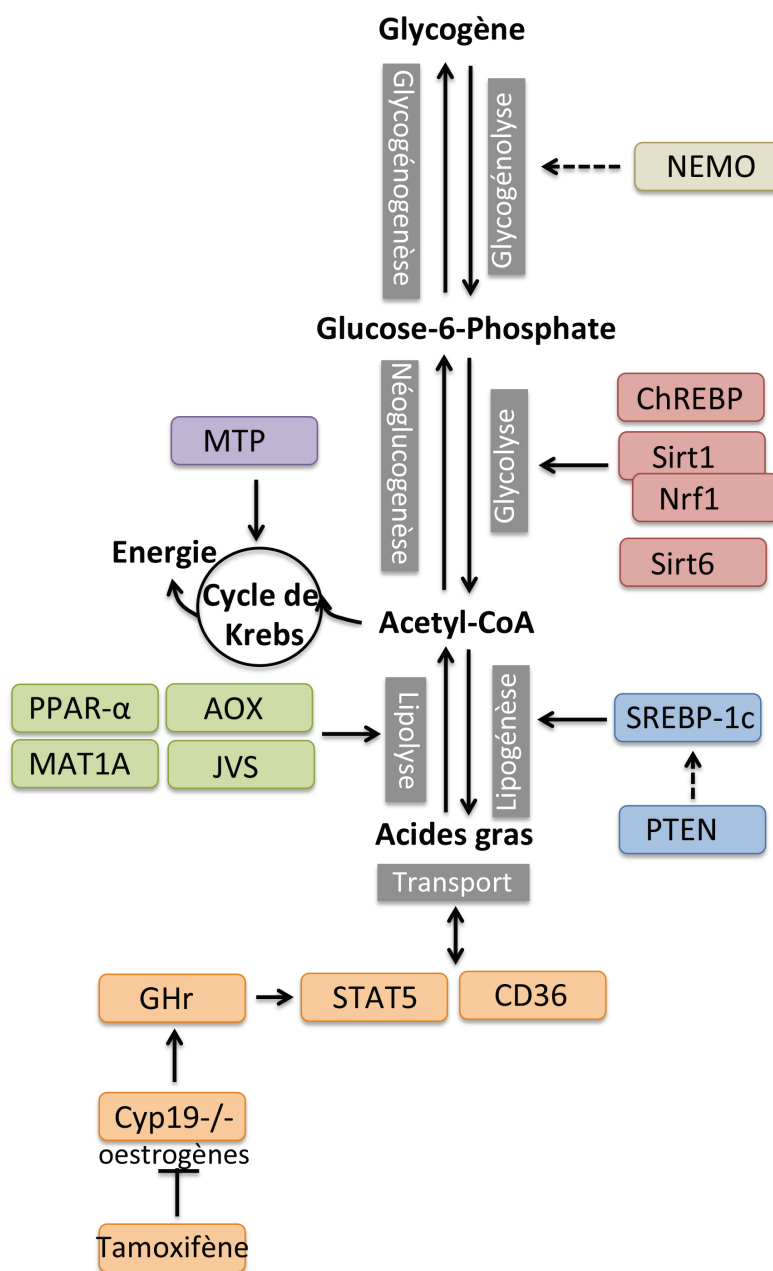


FIGURE 2.6 – Les modèles génétiques de stéatose hépatique et leur action sur le métabolisme du foie

Chapitre 3

La régénération hépatique

3.1 Les différents mécanismes de régénération des êtres vivants

La régénération représente la capacité pour un organisme vivant de reconstituer une partie lésée. Il est complexe d'obtenir un consensus autour d'une définition plus précise de la régénération puisque celle-ci peut illustrer différents mécanismes biologiques. Avant de parler plus spécifiquement de régénération hépatique, les sous-paragraphe ci-dessous synthétisent les quatre mécanismes de régénération existants en biologie.

3.1.1 La régénération tissulaire

Un des premiers mécanismes de régénération est la régénération physiologique des différents tissus composant l'organisme. Cette régénération ne s'effectue pas à la même vitesse et au même degré selon les organes, mais est généralement médiée par les cellules souches de chaque tissu. Ce phénomène participe ainsi à l'homéostasie tissulaire en préservant la balance mort cellulaire/renouvellement cellulaire.

3.1.2 La régénération morphallactique

La régénération morphallactique est un processus qui va en priorité faire intervenir un échange de cellules déjà différenciées pour aboutir à un remodelage de l'organisme qui sera plus petit *in fine*. Il n'y a que peu ou pas de prolifération cellulaire impliquée dans ce mécanisme que l'on retrouve essentiellement chez L'hydre [103].

3.1.3 La régénération épimorphique

La régénération épimorphique est un mécanisme connu depuis plus d'un siècle [104], qui fait intervenir la prolifération de cellules dédifférenciées présentes autour de la partie amputée, formant ainsi un blastème de régénération. On retrouve ce phénomène chez un certain nombre d'invertébrés (échinodermes, gastropodes, planaires, urochordés), mais aussi chez certains vertébrés comme la salamandre ou le lézard.

3.1.4 La régénération compensatrice

La régénération compensatrice fait intervenir des cellules déjà différenciées et qui conservent leurs fonctions spécifiques. Ces cellules vont se mettre à proliférer afin de régénérer la masse et la fonction d'un organe lésé. Le foie est le seul organe capable de régénérer à plus de 70% par hyperplasie compensatrice chez la plupart des vertébrés après insuffisance hépatique ou hépatectomie partielle. Parmi les quatre mécanismes de régénération, c'est le seul faisant intervenir une prolifération de cellules déjà différenciées. Ce phénomène va à l'encontre du paradigme habituel associant la différenciation cellulaire à une perte des capacités prolifératives.

3.2 Historique de la régénération hépatique

Il est assez compliqué de définir précisément quand les propriétés régénératives du foie ont été découvertes par l'Homme. Il y a évidemment cet exemple galvaudé de la mythologie grecque concernant la punition infligée à Prométhée par Zeus. Ce dernier avait déclenché son extraordinaire colère en ayant transmis le feu à l'humanité ainsi que pour nous avoir enseigné la civilisation et les arts. Pour cette raison, Prométhée fut attaché au mont Caucase, condamné à se faire dévorer le foie par un aigle. Les Dieux grecs ne manquaient pas d'ironie en matière de châtement puisque le foie se régénérerait chaque nuit, rendant ce supplice éternel. S'il est pourtant tentant de penser que les grecs connaissaient déjà les propriétés régénératives du foie à travers cette histoire, il semble aujourd'hui admis que leurs connaissances en médecine n'étaient pas suffisamment développées pour qu'ils aient déjà pu observer cette fonction.

En réalité, il faut attendre les premières chirurgies hépatiques pour entendre seulement parler, de façon très anecdotique, de régénération du foie. Au début du XVIIIème siècle, on peut retrouver quelques descriptions de résections hépatiques après blessures par couteau ou sur des soldats blessés pendant la guerre [105]. Par la suite, l'avènement d'un certain nombre de

progrès médicaux tels que l'anesthésie et l'asepsie entraîne une augmentation de ces pratiques chirurgicales puisqu'on dénombre un peu moins d'une centaine de cas de chirurgies hépatiques décrits pour des tumeur malignes ou bénignes à la fin du XIXème siècle.

C'est également à cette période que la recherche sur le foie s'accroît en Allemagne, pour documenter la régénération hépatique sur différents animaux [106][107] avant qu'Higgins et Anderson établissent un protocole d'hépatectomie partielle, qu'on utilise encore aujourd'hui en l'ayant quelque peu adapté [108]. Dans les années 60, George T. Pack arrive finalement à décrire clairement la capacité du foie humain à régénérer et il est établi que la régénération complète de tous les types cellulaires du foie s'obtient entre 3 à 6 mois [109]. Les dernières décennies ont laissé le soin à la biologie moléculaire de décortiquer à son tour le mécanisme de régénération hépatique au niveau moléculaire, ce qui a permis de considérablement améliorer les connaissances autour de la régénération du foie.

3.3 Les applications médicales

Aujourd'hui, la médecine s'appuie couramment sur les propriétés régénératives du foie pour un certain nombre d'applications. C'est le cas en particulier dans le cadre de transplantations hépatiques multiples ou encore des résections de tumeurs élargies ou en plusieurs temps (hépatocarcinomes, métastases de cancers colorectaux).

De façon plus anecdotique, on note l'utilisation temporaire de foie artificiel chez les patients souffrant d'insuffisance hépatique suite à une hépatite fulminante. Cette application part du principe que le foie du patient sera capable de régénérer et ne fait que pallier temporairement ses fonctions.

3.3.1 La transplantation hépatique

La transplantation hépatique partielle en bipartition ou « split »

Aux USA, environ 3000 personnes porteuses de maladies chroniques du foie meurent chaque année en attente d'une transplantation. Selon l'agence de Biomédecine, en 2010 en France, 7,1% des personnes inscrites sur liste d'attente pour un greffon hépatique sont décédées contre 3,7% en 2005 (Table 3.1). En terme de nombre, le don d'organe n'arrive malheureusement pas à suffire aux demandes de greffe qui augmentent d'année en année.

Pour pallier cette pénurie, il existe un type de transplantation qui consiste à séparer le foie d'un donneur en mort encéphalique en deux parties « split » pour en faire bénéficier deux receveurs. Dans la majorité des cas, ce type

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Liste d'attente							
En attente au 1er janvier	474	486	540	574	669	806	932
Nvx inscrits dans l'année	1219	1300	1346	1372	1466	1579	
Décédés dans l'année :	63	123	116	107	136	169	
<i>% décès parmi les inscrits</i>	3,7%	6,9%	6,2%	5,5%	6,4%	7,1%	
Sortis de la liste d'attente :	120	86	135	159	146	192	
<i>sortis pour aggravation</i>	49	31	51	85	81	112	
Greffes :	1024	1037	1061	1011	1047	1092	
<i>vivants apparentés</i>	49	36	18	10	12	17	
<i>morts par arrêt cardiaque</i>						3	
Greffes (pmh)	16,6	16,7	16,8	15,9	16,4	16,9	

TABLE 3.1 – Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe hépatique [366]

de transplantation s'utilise pour un enfant et un adulte en attente de foie ou de façon très rare, pour deux adultes de petite taille. Avec ce type de transplantation, les deux parties du foie vont être amenées à régénérer chez les deux receveurs pour reconstruire masse et fonction après l'opération [110].

La transplantation hépatique partielle à donneur vivant

Ce type de transplantation consiste à prélever une partie du foie chez un donneur vivant (le plus souvent un membre de la famille) pour le transplanter chez un patient en attente de greffe. Dans ce cas précis, chez le donneur comme le receveur, le foie régénérera entièrement à la suite de l'opération.

La transplantation hépatique auxiliaire

Inventée par le professeur Karim Boudjema dans les années 90, la transplantation hépatique auxiliaire s'adresse à des patients atteints d'hépatite fulminante (le plus souvent après l'ingestion d'une dose toxique de médicaments comme le paracétamol). Dans ce cas précis, l'équilibre entre la destruction des hépatocytes et leur capacité à régénérer est précaire et peut tantôt aboutir à la survie, tantôt à la mort du patient. C'est pourquoi une technique consiste à placer un petit greffon chez le patient pour pallier l'inefficacité temporaire du foie d'origine. Quand le foie est finalement parvenu à régénérer, le traitement immunosuppresseur est progressivement interrompu et le greffon s'atrophie [111].

3.3.2 La résection hépatique

La résection hépatique est une procédure chirurgicale visant à sectionner une partie du foie d'un patient, le plus souvent contenant une tumeur. Les indications de résection de cancers primitifs du foie étant limitées, la résection hépatique s'effectue de façon privilégiée sur les métastases de cancers colorectaux. Cependant, avec l'amélioration des techniques, certaines tumeurs considérées comme non résécables sont maintenant inscrites dans ce type de procédures. C'est le cas de certains carcinomes hépatocellulaires par exemple. Encore une fois, la résection hépatique nécessite de faire appel aux propriétés prolifératives du foie. On peut par ailleurs suivre la régénération hépatique après l'opération par analyse volumétrique par tomodensitométrie.

3.4 Les modèles de régénération hépatique en laboratoire

Dans un foie adulte, la plupart des hépatocytes sont quiescents (en G0) et seulement un très faible pourcentage de ceux-ci prolifère (moins de 0,1%). Il faut qu'un stimulus d'agression hépatique intervienne pour entraîner les hépatocytes à rentrer en cycle. Pour ce faire, il existe différentes techniques utilisées en laboratoire afin de déclencher et étudier la régénération hépatique. Les études *in vitro* présentent de nombreuses limitations et ne reproduisent pas fidèlement l'ensemble des signaux contrôlant ce processus complexe qui requiert, comme nous le verrons plus loin, l'intervention de différents types cellulaires comme les cellules endothéliales ou les macrophages du foie. Aussi, bien que cette technique ait permis d'isoler un certain nombre de voies de signalisation impliquées dans la régénération hépatique, la recherche se tourne essentiellement aujourd'hui vers des modèles d'études *in vivo*. Dès lors, il existe deux types d'agression pouvant initier la régénération hépatique *in vivo*. On peut utiliser un stimulus d'agression toxique pour le foie ou encore utiliser un stimulus d'agression physique qui consistera à sectionner physiquement une partie du foie.

3.4.1 L'injection de toxines

La réponse régénérative du foie après une agression toxique est une fonction essentielle puisqu'elle permet la détoxification de cet organe. Le signal induit entraîne une réaction de cicatrisation pro-fibrosante rapidement résorbée si l'agression s'arrête. La prolifération alors induite permet de préserver l'homéostasie du foie en remplaçant les cellules nécrosées. L'étude de ce mé-

canisme est donc parfaitement pertinente puisqu'il répond à de nombreuses situations cliniques. Il existe d'ailleurs un bon nombre d'hépatotoxiques pouvant être utilisés en laboratoire comme le tétrachlorure de carbone (CCL₄), le thioacétamide, l'acétaminophène, la galactosamine etc. Cependant, l'utilisation de toxines induit nécessairement une blessure hépatique qui s'accompagne de nécrose. Ceci rend difficile la lecture des signaux moléculaires qui déclenchent la prolifération hépatocytaire, parmi ceux qui induisent l'inflammation et la mort cellulaire. De plus, la prolifération non simultanée des hépatocytes complique davantage l'analyse de ce mécanisme. Certains expliquent cette mise en cycle asynchrone par l'action continue de ces toxines, qui agissent généralement sur plusieurs heures [112]. Aussi, à l'exception des quelques voies communes à différents modèles de régénération, peu de signaux moléculaires contrôlant ce type de prolifération hépatique ont été identifiés. La majorité de la recherche tentant de décrypter les différentes étapes de la régénération du foie se tourne vers le modèle de l'hépatectomie partielle et c'est essentiellement de ce mécanisme dont il sera question pour la suite de ce manuscrit.

3.4.2 L'hépatectomie partielle

Le mécanisme

L'hépatectomie partielle des 2/3 est une méthode utilisée depuis relativement longtemps pour étudier la régénération du foie. En effet, Higgins et Anderson ont été les premiers à établir un protocole d'hépatectomie à 70% dont nous nous inspirons encore grandement aujourd'hui [108]. A l'époque, elle consistait à ligaturer deux lobes simultanément. Aujourd'hui, l'hépatectomie partielle consiste à ligaturer et sectionner le lobe gauche puis le lobe médian [113]. Ce faisant, les 30% de cellules hépatiques résiduelles vont entrer en cycle de façon quasi-synchrone à commencer par les hépatocytes qui présenteront un pic de synthèse d'ADN aux alentours de 40h post hépatectomie chez les souris. La grande majorité des hépatocytes entre alors en prolifération et il suffit d'un à deux rounds de cycle cellulaire pour rétablir la masse hépatocytaire initiale [114]. Des expériences de transplantation en série chez les souris ont permis de montrer la capacité quasi infinie des hépatocytes à proliférer [115]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'entrée en phase S des hépatocytes est synchrone, mais s'effectue à n'importe quelle heure de la journée. Ce n'est pas le cas de l'entrée en mitose des hépatocytes qui est contrôlée par le rythme circadien par l'activation notamment de la protéine WEE1 [116].

Après les hépatocytes, les autres types cellulaires composant le foie entrent

ensuite en prolifération, ce qui permet d'évaluer la régénération complète du foie chez la souris à une quinzaine de jours. La synchronisation de la mise en route du cycle cellulaire est d'ailleurs un des plus évidents avantages de cette technique puisqu'elle permet d'étudier clairement le cycle cellulaire de façon générale, au delà même des hépatocytes.

L'étude de souris *knock out* a permis de dégager les principales voies de signalisation impliquées dans le mécanisme de régénération hépatique. Cependant, la grande majorité des souris mutées pour un gène n'entraîne qu'un simple retard de régénération après hépatectomie partielle. Certaines mutations chez la souris induisent une désynchronisation de la régénération mais ne l'inhibent pas complètement et presque aucun mutant aboutit à la mort systématique des souris après hépatectomie partielle. Ces différentes données ont permis d'établir de façon manifeste que la régénération du foie est un processus très complexe, bien synchronisé et régulé par de nombreuses voies de signalisation redondantes. On découpe ainsi la régénération du foie en trois grandes étapes.

La phase de *Priming*

La première phase initiant la régénération hépatique est celle dite de « *priming* ». En effet, elle permet aux hépatocytes qui sont alors quiescents, de devenir réceptifs aux facteurs de croissance en facilitant la transition G0/G1, afin qu'ils puissent ensuite entrer en phase S. Cette phase est habituellement associée à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, dont l'activation dépend de facteurs circulants dans les minutes suivant l'hépatectomie partielle.

Les facteurs circulants

Il est essentiel que les facteurs déclenchant la phase de « *priming* » jouent de rapidité. En effet, il a été montré que certains éléments sont déjà présents dans l'organisme et attendent simplement d'être relargués. C'est par exemple le cas des lipopolysaccharide (LPS) présents dans la flore intestinale et relargués par les intestins dans les minutes qui suivent l'hépatectomie partielle en raison du stress chirurgical. Les LPS arrivent dans le foie par la veine porte et interagissent avec les cellules de Kupffer induisant les sécrétions de TNF- α [117]. D'autres éléments s'activant aussi rapidement que le LPS sont les compléments C3a et C5a [118], la sérotonine [119] ainsi que Myeloid differentiation factor 88 (Myd88) [120], qui participent également à l'activation des cytokines pro-inflammatoires. Etant donné leur rôle activateur sur l'ensemble du programme de régénération hépatique, de nombreux chercheurs ont initialement postulé qu'on pourrait identifier et isoler un seul gène contrôlant le processus de régénération du foie. Cette hypothèse un peu passéiste a laissé

place à une vision beaucoup plus complexe faisant intervenir de nombreuses voies de signalisation impliquant beaucoup de redondances entre elles.

Les cytokines pro-inflammatoires

L'ensemble de ces signaux amène donc à la sécrétion de TNF- α qui se lie à son récepteur sur les cellules de Kupffer. Ceci entraîne une expression d'IL-6 par l'intermédiaire de l'activation de la voie NF- κ B. Au niveau des hépatocytes, le récepteur à l'IL-6 répond en activant la voie JAK/STAT par un jeu de phosphorylations dépendant de gp130. La protéine STAT3 nouvellement activée induit alors l'expression d'une panoplie de gènes dits « *immediate early genes* » qui sont essentiels pour permettre aux hépatocytes d'effectuer la transition G0/G1 mais aussi pour protéger les hépatocytes de signaux nécrotiques ou apoptotiques [114]. Parmi les plus connus, on note *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* et *c-met* [121]. SOCS3, une autre des cibles de STAT3, agit comme rétrocontrôle négatif sur la phosphorylation de ce dernier [122]. Même s'il apparaît clair aujourd'hui que les cytokines contrôlent l'initiation de la régénération hépatique, le rôle précis de chacune d'elles après l'hépatectomie partielle est parfois soumis à débat. En effet, la mutation du récepteur au TNF- α [123] ou l'injection d'anticorps contre le TNF [124] induit un défaut de régénération après hépatectomie bien le KO du TNF ne semble pas avoir le même effet [125]. D'autres ligands du récepteur au TNF ont alors été proposés comme essentiels tels que la lymphotoxine- α [126]. De même, les premiers mutants IL-6 ont mis en évidence un défaut de régénération après hépatectomie partielle [127] lié à une diminution de l'activation de la voie STAT3. Plus tard, la délétion spécifique du foie de la glycoprotéine 130 (gp130) a également montré un défaut de régénération après hépatectomie des deux tiers accompagné d'une absence d'activation de STAT3 [128]. D'autre part, le KO de STAT3 spécifique des hépatocytes induit clairement un défaut de régénération accompagné d'anomalies d'activation des « *immediate early genes* » [129] (Figure 3.1).

La transition G1/S

Après avoir effectué la transition G0/G1, les hépatocytes deviennent alors réceptifs à une seconde vague de signaux qui à leur tour contrôlent la transition G1/S. Cette deuxième étape se découpe en réalité en deux phases concomitantes, l'une métabolique, l'autre faisant intervenir des facteurs de croissance.

La phase métabolique

Après l'hépatectomie partielle, le foie résiduel doit exécuter la double mis-

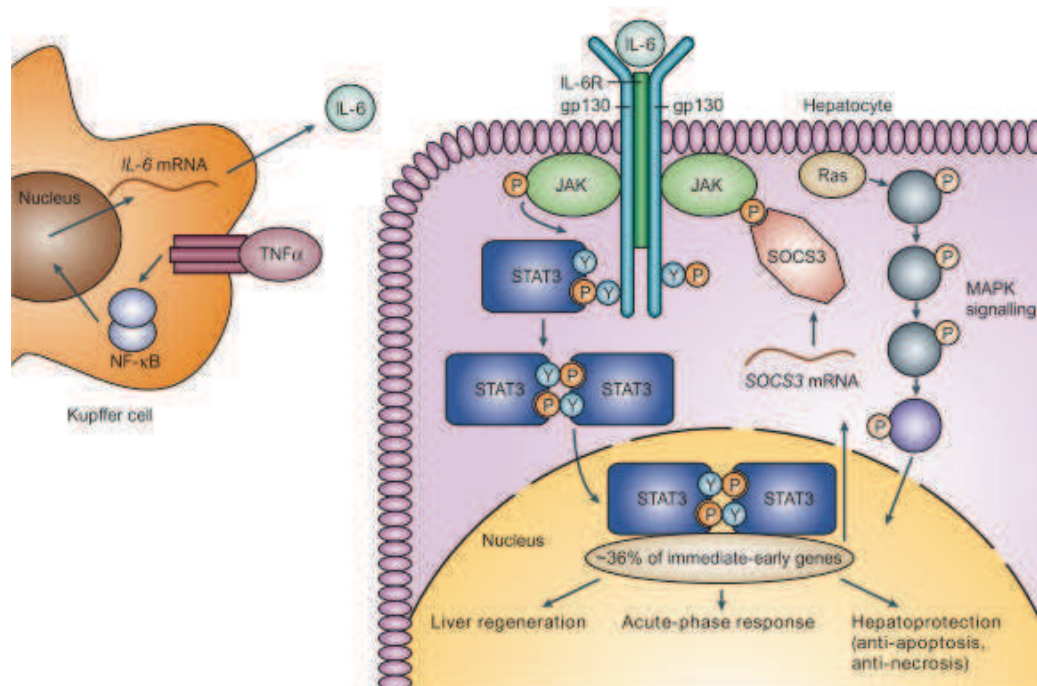


FIGURE 3.1 – La phase de priming résumant l'interaction entre les cellules de Kupffer et les hépatocytes déclenchant l'expression des cytokines pro-inflammatoires de la phase de « *Priming* » [130]

sion de régénérer et de répondre aux demandes métaboliques habituelles de l'organisme. En conséquence, il y a une plus forte concentration de signaux métaboliques qui dialoguent nécessairement avec les signaux de régénération. Une des manifestations les plus évidentes de cette voie métabolique est l'accumulation de triglycérides que l'on retrouve au sein des hépatocytes entre 12 et 24h après hépatectomie partielle [131] mais qui a également été décrite en culture cellulaire [132]. *In vivo*, on a expliqué ce phénomène par l'apparition d'une hypoglycémie juste après l'hépatectomie partielle qui engendre une lipolyse induisant elle-même la formation de gouttelettes lipidiques dans le foie. L'inhibition de cette accumulation de triglycérides par injection de leptine résulte en une prolifération altérée après hépatectomie partielle [133]. De plus, en utilisant un modèle de souris délétées pour la cavéoline – une molécule impliquée dans la formation des vésicules de mêmes noms – il a été montré une diminution importante de l'accumulation de triglycérides post hépatectomie ainsi qu'un blocage du cycle cellulaire [134]. Cette étude a néanmoins été contredite par une plus récente [135]. Une autre équipe a par ailleurs utilisé différents modèles génétiques altérant le métabolisme lipidique pour montrer qu'un défaut d'accumulation des triglycérides après hépatectomie n'impactait pas la régénération du foie de façon significative [136]. Beaucoup d'études tendent à infirmer ou confirmer l'hypothèse de la stéatose transitoire comme élément essentiel à la régénération hépatique. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, aucun des modèles utilisés n'induit d'inhibition totale de l'accumulation de triglycérides post hépatectomie et l'absence de véritable cinétique de prolifération hépatique rend impossible l'étude d'une corrélation entre stéatose transitoire et régénération du foie. De plus, peu d'hypothèses ont été proposées pour l'expliquer le rôle de cette stéatose transitoire. On avance tantôt celui d'une réserve énergétique produite par ce gras, tantôt celui d'une réserve de phospholipides pour renouveler la membrane plasmique lors de la prolifération hépatocytaire subséquente. Il est néanmoins intéressant de constater le paradoxe évident de cette phase métabolique. En effet, la régénération du foie ne peut s'effectuer qu'à la condition d'accumuler du gras de façon transitoire, tandis que la stéatose hépatique entraîne un défaut de régénération après hépatectomie partielle [137].

La voie PDK1/AKT a été montrée comme participant à la croissance cellulaire en jouant davantage sur le métabolisme via une augmentation de taille des hépatocytes. Cette voie participe d'autant plus à une augmentation de la taille cellulaire quand la régénération est altérée sans restaurer la prolifération hépatocytaire post hépatectomie [138]. L'augmentation de la taille cellulaire semble surtout vraie dans le cadre de l'hépatectomie de 1/3 seulement [139].

Les facteurs de croissance

La deuxième phase, clairement plus documentée, s'intéresse aux facteurs de croissance qui sont exprimés au cours de la régénération hépatique. Les premiers travaux ayant suggéré l'importance de facteurs de croissance au cours de la régénération hépatique viennent d'expériences de parabiose menées dans les années 70. Ces études montrèrent que les facteurs de croissance présents dans la circulation de rats hépatectomisés pouvaient induire la prolifération des hépatocytes de rats non hépatectomisés. Par la suite, des expériences de culture primaire d'hépatocytes ont permis d'isoler certains de ces facteurs de croissance tels que l'HGF et le TGF- α .

On sait à présent que deux grandes voies de signalisation répondant à leur facteurs de croissance respectifs contrôlent l'entrée en phase S des hépatocytes médiée respectivement par deux récepteurs : le récepteur à l'EGF (EGFR) et C-Met. Après hépatectomie partielle, HB-EGF, EGF, amphireguline, et TGF- α sont sécrétés et interagissent avec le récepteur EGFR et HGF se lie à son récepteur C-Met selon une cinétique parfaitement ordonnée. Ces facteurs de croissance proviennent de types cellulaires différents. On sait notamment que l'HB-EGF est relargué par le duodénum, que l'EGF est sécrété par les glandes salivaires en majorité ou encore que le TGF- α provient des hépatocytes. L'HGF vient quant à lui des cellules non parenchymateuses, en particulier des cellules étoilées sous forme de pro-HGF. Celui-ci est initialement clivé par la protéase urokinase-type plasminogen activator (uPA) pour agir de façon paracrine sur les hépatocytes.

La voie HGF joue un rôle essentiel dans le contrôle de la régénération hépatique. Il a été montré que la mutation du récepteur C-Met spécifiquement dans le foie induit un défaut de transition G1/S des hépatocytes après hépatectomie partielle [140], à l'image du blocage du récepteur C-Met et de son ligand HGF par ARN interférence [141]. Par ailleurs, on a également souligné le rôle de cette voie dans la transition G2/M des hépatocytes qui agit sur la voie ERK1/2 [142].

La mutation des ligands de l'EGFR ou du récepteur lui-même entraîne également un effondrement de la prolifération hépatocytaire qui s'en retrouve parfaitement désynchronisée. Du fait de son implication dans notre hypothèse de travail, l'importance de la voie EGFR dans le contrôle de la transition G1/S au cours de la régénération hépatique sera par ailleurs développée dans le prochain chapitre.

Plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et la croissance en particulier ont souvent été décrites comme activées par l'EGFR ou C-Met dans le foie post hépatectomie, même si aucune démonstration stricte ne permet de l'établir. Parmi celles-ci, on note la voie des MAP kinases, STAT3, AKT et ERK1/2. La suppression de SOCS3 (un ré-

trocontrôle négatif de STAT3) augmente la prolifération hépatocytaire post-hépatectomie [143] et la délétion spécifique de STAT3 dans le foie montre un effet inhibiteur [144]. De façon intéressante, même si la délétion de STAT3 joue sur l'entrée en phase S des hépatocytes, elle n'entrave pas totalement le processus de régénération qui s'effectue par augmentation de la taille cellulaire en jouant sur la voie AKT/mTOR [145]. En effet, l'inhibition de la voie PI3K/AKT révèle un contrôle de cette voie plus évident sur la taille cellulaire que sur la prolifération post hépatectomie [146]. Pour finir, ERK1/2 a clairement été identifié comme essentiel à la prolifération hépatocytaire à la fois *in vivo* post hépatectomie mais aussi *in vitro* [147]. Il existe très certainement d'autres cibles encore non identifiées de l'EGFR et C-Met mais les dialogues existant entre ces deux voies rendent leur identification compliquée (Figure 3.2).

D'autres mitogènes ont également montré leur implication au cours de la régénération hépatique. Parmi ces derniers, on peut notamment citer le « *fibroblast growth factor receptor* » (FGFR) dont la délétion entraîne un défaut de régénération post-hépatectomie [148] ou le « *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* » (PDGFR), dont l'absence se trouve néanmoins compensée par une augmentation des voies EGFR et C-Met [149]. Il existe également la délétion du récepteur à l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1R) qui provoque aussi une diminution importante de la prolifération hépatocytaire post hépatectomie chez les souris mâles [150]. Il existe de nombreux autres mitogènes dont on soupçonne un rôle au cours de la prolifération comme l'Oncostatine qui régulerait la voie IL-6 ou encore BMP, mais aucune démonstration claire n'a permis de déterminer leur rôle dans la régénération hépatique. Finalement, les deux grandes voies de signalisation EGFR et C-Met restent les deux principales voies contrôlant la transition G1/S au cours de ce processus. Après cette transition, il n'y a plus aucun point de blocage du cycle cellulaire, les hépatocytes effectuent donc leur phase S, G2 et leur mitose afin de restaurer la masse hépatique initiale.

La phase de terminaison

L'étape contrôlant l'arrêt de la prolifération hépatocytaire à la fin du processus de régénération est très certainement la moins étudiée. Pourtant, comprendre les signaux moléculaires qui vont réguler le volume hépatique final, est évidemment très intéressant. Par ailleurs, on sait aujourd'hui que cette phase fait intervenir aussi bien des facteurs contrôlant l'arrêt de la prolifération que certains signaux apoptotiques [151]. Il semblerait également que ce soit une modification de la balance entre la diminution de voies de signalisation pro-proliférantes et l'augmentation de voies de signalisation anti-

proliférantes qui contrôle finement ce mécanisme.

On a notamment pu observer une augmentation de SOCS3 vers la fin de la régénération hépatique, bloquant l'expression de l'IL-6 [152]. D'autre part, la reconstitution de la matrice extracellulaire inhibe le clivage du pro-HGF vers HGF en induisant l'inhibiteur du plasminogen activator (PAI) [153].

Le TGF- β et l'activine sont les deux voies majeures anti-proliférantes qui ont été décrites comme contrôlant la fin de la régénération hépatique en utilisant la voie des SMADs. L'expression du TGF- β croît progressivement à partir de 24h post hépatectomie avec un pic d'expression à 72h [154]. Il serait cependant inactivé avant la fin de la régénération hépatique par l' α 2 macroglobuline dans le plasma [155]. D'autre part, pendant le même temps, il existerait initialement une diminution du récepteur au TGF- β qui empêcherait la signalisation de cette voie avant l'étape de terminaison [156]. Le même type de mécanisme a été décrit pour l'activine avec une diminution de son récepteur au cours de la régénération qui remonte en fin de prolifération hépatocytaire [157]. Ces données sont cependant contredites par une étude portant sur la délétion du TGF β R1 qui induit une hyperprolifération des hépatocytes post-hépatectomie par rapport aux contrôles. En revanche, cette délétion est sans conséquence sur la terminaison de la régénération hépatique sauf si elle se retrouve combinée avec une autre délétion pour le récepteur à l'activine [158]. Le dernier chapitre de l'introduction se concentrera davantage sur la voie TGF- β et son rôle dans la régénération hépatique post hépatectomie (Figure 3.2).

D'autres voies de signalisation impliquées dans la régénération hépatique

Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence l'importance des acides biliaires dans le contrôle de la régénération hépatique. L'augmentation des acides biliaires après hépatectomie partielle a ainsi été décrite comme le signal d'une diminution des capacités fonctionnelles du foie. On a notamment décrit le rôle du Farnesoid X Receptor (FXR), récepteur endogène des acides biliaires qui régulent leur niveau, agissant comme un senseur et stimulant la prolifération et la protection hépatique. Après hépatectomie partielle, FXR répond à l'augmentation des acides biliaires en se translocant dans le noyau pour activer différents gènes impliqués dans la prolifération, notamment Foxm1b [160]. Plus récemment, une autre équipe a montré le rôle protecteur du récepteur aux acides biliaires TGR5 au cours de la régénération hépatique. D'une part, l'absence de ce récepteur induit la sécrétion d'une bile plus hydrophobe et une surcharge d'acides biliaires qui amène à de la nécrose hépatocytaire. D'autre part, on observe une hypersécrétion des

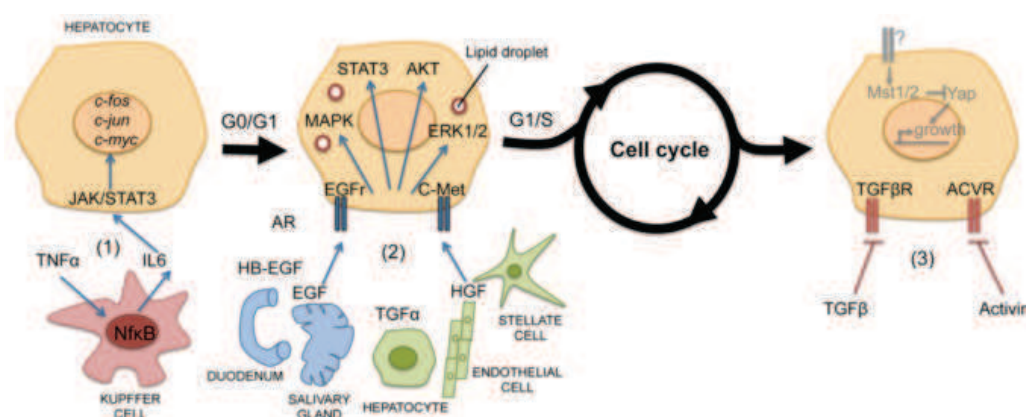


FIGURE 3.2 – Les principales étapes de la régénération hépatique post hépatectomie. (1) la phase de « Priming » illustrée par l'expression des cytokines pro-inflammatoires. (2) la phase métabolique résumée par l'accumulation de gouttelettes lipidiques et de facteurs de croissance représentés par les deux grandes voies de signalisation EGFR et C-Met. (3) la phase de terminaison schématisée par l'activation des voies de signalisation TGF- β et l'Activine [159]

cytokines conduisant à une augmentation de l'inflammation post hépatectomie. L'ensemble de ces dérégulations au cours de la régénération hépatique entraîne un retard de complétion de celle-ci [161]. La voie de signalisation Hippo (Mst1/2 chez les mammifères)/YAP a aussi été liée à la prolifération. L'inactivation de Mst1/2 au niveau hépatique chez la souris induit une translocation nucléaire de Yap et une activation de ces cibles qui entraîne une hyperprolifération cellulaire [159]. Mst1/2 pourrait être considéré comme un gardien de la taille du foie, suggérant un rôle potentiel de contrôle au cours de la régénération (Figure 3.3). De plus, plusieurs études ont montré l'importance des signaux calciques intracellulaires pour réguler le cycle des hépatocytes après hépatectomie. En effet, ces signaux calciques ont des conséquences sur la transcription des gènes, l'expression des cyclines ou encore la phosphorylation de plusieurs protéines, notamment Erk au cours de la régénération hépatique [162].

Les connaissances des mécanismes régulant la régénération du foie post hépatectomie se sont considérablement développées ces dernières décennies. Même si certaines voies de signalisation sont aujourd'hui étudiées en profondeur et les différentes étapes du processus bien délimitées, il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'un phénomène excessivement complexe aux signaux multiples et souvent redondants. Il serait assez ambitieux de vouloir le décrire de façon exhaustive, puisque chaque année de nouvelles découvertes semblent

apporter leur lot de complexité au mécanisme. L'avènement des puces à ADN [163], la mutagenèse insertionnelle par transposons [164], l'étude des micro ARNs [165] sont autant d'exemples qui nous permettent d'entrevoir la véritable complexité du mécanisme de régénération hépatique post hépatectomie.

A titre d'exemple, un article publié récemment dans la revue *Cell* a utilisé un crible de micro ARNs de grande ampleur pour montrer l'importance d'une kinase du nom de Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) dans le contrôle de la régénération hépatique. Son inhibition entraîne une accélération et une augmentation de la prolifération hépatocytaire post hépatectomie en permettant l'augmentation de MKK7 [166]. Ceci souligne à nouveau l'implication d'une nouvelle grande voie contrôlant la régénération du foie.

3.5 Défaut de régénération du foie en cas de stéatose hépatique

Il existe certaines situations physiopathologiques pour lesquelles on observe un défaut de régénération du foie chez l'Homme mais aussi chez les rongeurs. C'est le cas notamment de la cirrhose, lors du vieillissement mais aussi au cours de la stéatose hépatique. Dans ce dernier cas, des travaux expérimentaux effectués sur différents modèles murins, de même que des études cliniques ont souligné un retard majeur de régénération hépatique depuis de nombreuses années déjà. Encore aujourd'hui, on connaît très peu de choses des voies de signalisation impliquées dans ce défaut de prolifération hépatocytaire associé à la stéatose qui fait l'objet de mon projet de thèse. Par conséquent, les points A. et B. ci dessous seront essentiellement descriptifs.

3.5.1 Stéatose et régénération chez l'Homme

Même si certains relativisent qu'une faible stéatose n'a que peu d'incidence sur certaines interventions chirurgicales [167], il est communément admis que la stéatose hépatique est associée à des échecs de procédures chirurgicales et à un risque de morbidité et mortalité accrues en post opératoire notamment après transplantation [168] ou résection hépatique [169]. En conséquence, malgré le manque d'organes disponibles, les foies présentant plus de 30% de stéatose ne sont pas utilisés pour les transplantations hépatiques en raison du trop grand risque qu'ils représentent [170]. Une autre étude s'intéressant aux effets toxiques des médicaments a révélé des dommages plus importants et un plus long temps de restauration des fonctions hépatiques en cas de stéatose hépatique [171]. Bien que personne n'ait pu

étudier précisément les mécanismes aboutissant à ces complications en cas de stéatose, beaucoup soulignent une potentielle diminution des capacités régénératives du foie dans ces différents cas. Une étude portant sur le suivi des patients jusqu'à 6 mois après l'opération abonde également dans ce sens [172]. Cette situation est d'autant plus alarmante que les patients justifiant d'une intervention chirurgicale et présentant une stéatose sont, comme nous l'avons vu précédemment, de plus en plus nombreux. A titre d'exemple, les résections de carcinomes hépatocellulaires sur foie stéatosique ont augmenté d'un facteur 6 au cours de ces dix dernières années [173]. Pour ces différentes raisons, certains travaux se sont penchés sur des modèles murins, pour y étudier les capacités régénératives du foie en cas de stéatose.

3.5.2 Stéatose et régénération sur modèles murins

Les études portant sur la régénération hépatique en cas de stéatose sur modèles murins se sont développées ces 15 dernières années et ont abouti à des résultats parfois contradictoires. En effet, alors que la majorité des recherches montre un défaut de régénération hépatique post hépatectomie partielle, d'autres études ne parviennent pas à mettre en évidence un quelconque défaut. En réalité, certaines différences s'expliquent probablement par la variabilité des modèles utilisés ou par des cinétiques de prolifération parfois trop peu détaillées. Par exemple, deux études utilisant exactement le même régime « *High Fat Diet* » ont trouvé un défaut de régénération pour l'une [174] et pas pour l'autre [175]. Cependant, le temps de régime variait de 9 et 13 semaines pour la première et de 6 semaines maximum pour la seconde. D'autre part, ce défaut de régénération semble se confirmer dans différents modèles d'agression toxique. L'acétaminophène a des effets plus toxiques sur foies stéatosiques [176] ou encore l'injection de CCL4 inhibe clairement la prolifération hépatocytaire de souris *ob/ob* [177]. Au final, à la lumière de l'ensemble des études, il est maintenant communément admis que la stéatose hépatique tend à induire des défauts de régénération précocement dans le cycle cellulaire, notamment au niveau de la transition G1/S. Comme illustré dans la table 3.2, les différentes études effectuées au cours de ces dernières années mettent en avant pour la majorité une dérégulation des voies inflammatoires sans véritablement entrer dans des explications moléculaires plus développées.

Les deux prochains chapitres s'intéresseront à deux voies de signalisation importantes pour contrôler la régénération hépatique. Le premier chapitre développera la voie EGFR dans son ensemble, qui est connue pour agir positivement sur la régénération en induisant des signaux pro-prolifératifs et qui

Article	Modèle(s) utilisé(s)	Régénération	Cible(s) moléculaire(s)
[178]	<i>ob/ob</i>	✗	↓ NF- κ B
[179]	<i>ob/ob</i>	✗	↑ STAT3 et ↑ p21
[180]	<i>ob/ob</i>	✗	VEGF
[181]	<i>ob/ob</i>	✗	?
[182]	Rat Zucker	✗	↓ IL-6
[183]	Db/Db	✗	?
[184]	Db/Db	✗	↓ Wee et ↓ Mit1
[185]	MCD	✓	—
[186]	MCD	✗	↑ IL-6 et ↑ TNF- α
[187]	MCD	✗	?
[188]	Orotic acid	✓	—
[189]	MCD	✓	—
[189]	Choline déficient	✗ (délais)	?
[174]	HFD	✗	↓ I κ B α et ↓ NF- κ B
[175]	HFD	✓	—
[190]	HFD	✗	↑ ER stress et ↓ Erk1/2
[191]	Régime fructose	✗	↓ TGF- β 1
[192]	AOX-/-	✓	—
[136]	L-Fabp-/-	✓	—
[136]	PPAR α	✓	—
[136]	MTP-IKO	✓	—
[136]	FAS-KOL	✓	—
[193]	KK-A y	✗	↑ STAT3 et ↑ SOCS3

TABLE 3.2 – Résumé de l'ensemble des articles consacrés à la recherche sur la régénération du foie en cas de stéatose hépatique sur modèles murins. Il est précisé les modèles utilisés, l'impact sur la régénération hépatique et les voies de signalisation isolées

✗ : Défaut de régénération

✓ : Régénération normale.

a fait l'objet essentiel de mes investigations dans mon projet de doctorat. Le second détaillera la voie TGF- β , qui joue négativement sur la régénération hépatique en activant des signaux antiprolifératifs et que j'ai trouvée perturbée dans mon étude du défaut de régénération du foie stéatosique. Schématiquement, on peut représenter ces deux voies comme une balance permettant à la régénération post-hépatectomie de s'effectuer correctement.

Chapitre 4

La voie de signalisation EGFR dans la régénération hépatique

4.1 Description générale

L'EGFR, aussi appelé ErbB-1, est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinases (RTKs) ErbBs, conjointement avec ErbB-2, ErbB-3 et ErbB-4 [194]. L'EGFR est le premier membre de cette famille, ainsi que le premier RTK à avoir été découvert en 1963 [195]. Il joue un rôle essentiel à l'égard du développement des tissus épithéliaux, mais est aussi à l'origine des tumeurs de ces mêmes tissus [196].

D'autre part, la délétion de l'EGFR chez la souris est létale entre la mi-gestation et la troisième semaine de vie en fonction des souches de souris. Les souris présentent par ailleurs de multiples anomalies au niveau de la peau, du rein, du cerveau, du tractus gastro-intestinal ainsi que du foie, avec un épaississement des lobules hépatiques, des malformations anatomiques des sinusoides ainsi que des noyaux anormalement vacuolés [197].

D'un point de vue structurel, en plus de son domaine tyrosine kinase cytoplasmique très conservé, cette protéine possède une région transmembranaire ainsi qu'un domaine extracellulaire riche en cystéines. Lorsque qu'un ligand se lie au récepteur, ce dernier peut soit s'homo- ou s'hétéro-dimériser avec d'autres membres de la famille ErbB [198]. Ceci entraîne l'autophosphorylation de ces résidus tyrosines qui vont recruter un certain nombre de partenaires pour permettre l'activation de toute une cascade de signaux intracellulaires. L'ensemble de voies activées par l'EGFR est connu pour être impliqué dans la croissance, la différenciation, la prolifération cellulaire, la motilité cellulaire, le contrôle de l'apoptose, la transition épithélio-mésenchymateuse et la surexpression des métalloprotéases matricielles [199]. On a aussi prêté à

l'EGFR un rôle dans le maintien des cellules souches ainsi que dans le cancer [200], mais ces thématiques ne seront pas abordées dans ce chapitre.

Le turnover de l'EGFR est contrôlé par l'endosome. Quand un ligand se lie sur le récepteur, ce dernier rentre dans la cellule et est transporté vers une vésicule d'internalisation. Ensuite, en fonction de la stabilité du complexe EGFR/ligand et de l'ubiquitination du récepteur, il y aura soit une dégradation complète dans le compartiment lysosomal, soit un recyclage vers la membrane [201]. Ce procédé permet de moduler finement la signalisation EGFR en proposant un mécanisme de rétrocontrôle négatif [202]. Il a également été montré que l'EGFR peut réguler ses cibles en transloquant sa région interne dans le noyau pour activer des gènes tels que la cycline D1 [203] ou des gènes de l'inflammation comme COX-2 [204].

4.2 L'EGFR dans le foie

L'EGFR est fortement exprimé dans le foie adulte, mais aussi durant le développement ainsi que pendant la régénération hépatique, ce qui laisse suggérer qu'il a une importance prépondérante au cours de ces trois situations [205]. La délétion spécifique de l'EGFR au niveau des hépatocytes chez la souris n'expose pas de phénotype particulier, si ce n'est une légère diminution du poids de l'animal [206]. Plusieurs ligands peuvent se lier sur ce récepteur, tels que l'ampiréguline (AREG), le Facteur de Croissance Epidermique (EGF), l'Heparin-Binding EGF (HB-EGF), la bétacelluline (BTC), l'épiréguline (EPR) et le Facteur de Croissance de Transformation- α (TGF- α) [207]. Il n'existe pas de démonstration précise qui prouve que ces ligands se fixent sur l'EGFR et non pas sur d'autres ErbB qui dimérisent ensuite avec l'EGFR. Néanmoins, certains d'entre eux ont été démontrés comme essentiels à la régénération hépatique [114].

Il existe quatre grandes voies de signalisation décrites comme activées par l'EGFR. On note la voie des Ras/MAPK, des STATs, de PI3K/Akt, et de la Phospholipase C- γ (PLC γ) [208]. On sait également que l'activation des voies dépend de l'affinité de certains ligands à l'EGFR. Les ligands de haute affinité activent les voies des Ras/MAPK et PI3K/Akt, tandis que les voies de faible affinité activent la voie des STATs et PLC γ [209]. Il est de plus en plus évident que ces différentes voies de signalisation sont interconnectées entre elles, mais pour la clarté de la lecture, elles seront décrites séparément ci-dessous.

L'activation de la partie intracellulaire de l'EGFR sert de site de fixation pour des protéines possédant le domaine d'homologie Src, telles que Grb2 et Shc. Ces dernières interagissent avec Ras/Raf qui va conduire à l'activation

de la voie des MAPK [210]. Alternativement, l'activation d'EGFR peut révéler un site de fixation pour p85, une sous unité de PI3K. Ceci amènera à l'activation d'AKT pour jouer sur la survie cellulaire et la prolifération [211]. Dans le foie, l'activation de la voie des STATs par l'EGFR n'est pas sous la dépendance des kinases JAK comme on l'observe habituellement. A la place, les STATs sont phosphorylés en se liant directement à l'EGFR [212]. Il a par ailleurs été montré récemment que la kinase Src activerait les STATs par l'intermédiaire d'EGFR [213]. Quant à la voie $PLC\gamma$, son mécanisme d'activation par l'EGFR reste incertain. Il semble que cette protéine se lie elle aussi directement à l'EGFR mais qu'elle ne nécessite pas la phosphorylation de tyrosines [214]. L'activation de $PLC\gamma$ entraînera la formation de diacylglycérol (DAG) et de triphosphoinositol (IP3). DAG activera la Protéine Kinase C (PKC), tandis que l'IP3 activera des voies de signalisation dépendantes de la concentration de calcium [215] (Figure 4.1).

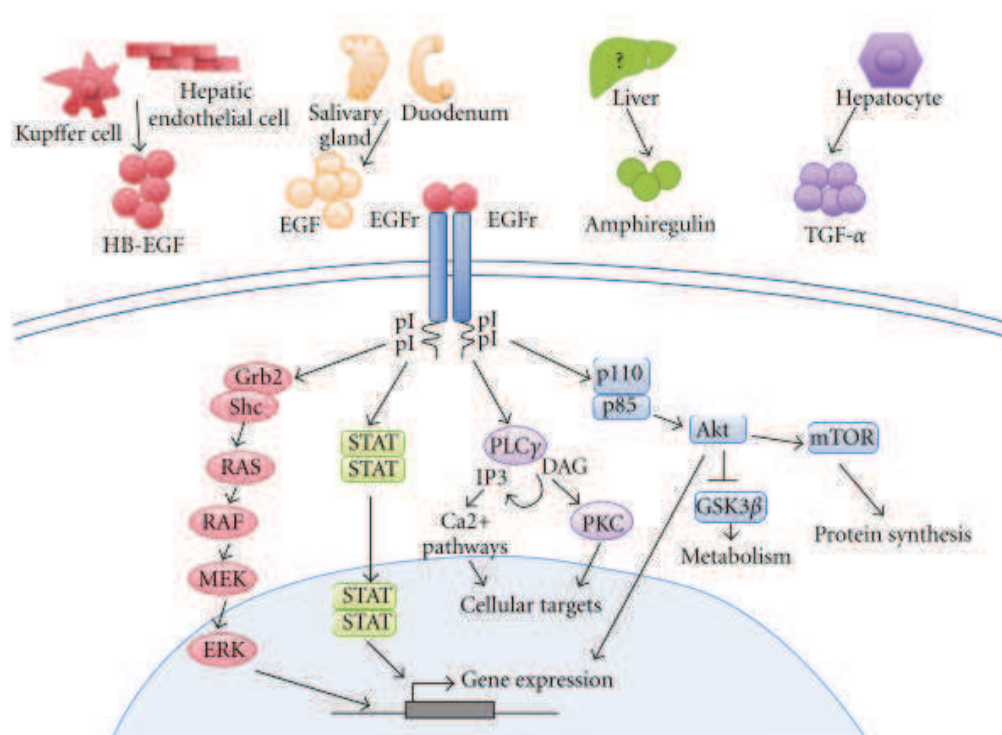


FIGURE 4.1 – La voie EGFR dans le foie : sources majeures des ligands de l'EGFR ainsi que quatre grandes voies connues comme étant activées en aval [200].

4.3 Le contrôle de la voie de signalisation EGFR sur la régénération hépatique

4.3.1 Par les ligands

Les premières expériences démontrant le fort potentiel mitogène de la voie EGFR ont été réalisées *in vitro*. En effet, les auteurs avaient alors testé la capacité de différents ligands à induire la prolifération cellulaire sur des cultures d'hépatocytes privés de sérum. Ces expériences ont permis d'isoler l'EGF [216], le TGF- α [216], l'HB-EGF [217] et l'AREG [218] puisque chacun d'eux permettait une entrée synchronisée en phase S des hépatocytes. D'autre part, le niveau protéique de ces ligands a été montré comme augmentant rapidement après hépatectomie [219]. Leur potentiel mitogène fut ensuite étudié *in vivo* par injection, surexpression, ARN interférence et délétion conditionnelle. A titre d'exemple, la perte d'expression d'HB-EGF dans le foie induit un défaut de régénération majeur [220] tandis que la surexpression de ce même ligand augmente la prolifération hépatocytaire post hépatectomie comparée aux contrôles [221]. On observe aussi que l'ablation des glandes salivaires qui produisent l'EGF entraîne un blocage des hépatocytes en phase G1 post hépatectomie, ce blocage étant restauré par l'injection d'EGF [222]. Le même phénotype est obtenu avec la délétion spécifique de l'AREG [223]. De façon surprenante, l'inactivation du TGF- α ne donne pas de phénotype particulier *in vivo* [224]. Ceci s'explique peut être par l'activation un peu plus tardive du TGF- α *in vivo* par rapport aux autres ligands. Au final, la dérégulation des trois premiers ligands conduit à des défauts de prolifération majeurs après hépatectomie sur modèles murins, qui se manifestent par une désynchronisation de l'entrée en phase S des hépatocytes. Ces résultats semblent indiquer que le rôle de chacun de ces ligands est bien spécifique et qu'ils ne sont pas redondants entre eux au cours de la régénération du foie. On peut postuler qu'il est nécessaire que chacun des ligands soit exprimés et se lie au récepteur de façon séquentielle pour activer correctement l'ensemble des cascades en aval. On peut également penser qu'il faut atteindre un certain palier quantitatif de ligands pour induire des signaux prolifératifs.

4.3.2 Par le récepteur

Quelques expériences de culture cellulaire délétant spécifiquement l'EGFR ont résulté en une diminution de la prolifération. Une étude sur des hépatocytes de rats a utilisé un inhibiteur pharmacologique permettant d'observer un blocage de la division cellulaire [225]. Une autre équipe travaillant sur des

fibroblastes a testé un inhibiteur pharmacologique, des ARN interférents et des lignées déficientes en EGFR pour observer les mêmes effets. Dans le cas présent, les auteurs observaient la voie des MAPK dérégulée par l'absence d'EGFR [226].

Pour aller plus loin, trois études se sont intéressées à invalider spécifiquement l'EGFR au cours de la régénération hépatique pour y établir son rôle exact, cette fois *in vivo*. La première a utilisé une stratégie d'injection d'anticorps anti-EGFR et n'est pas parvenue à observer un effet sur la régénération du foie [227]. Pour autant, les auteurs n'ont pas effectué une étude approfondie de la prolifération hépatique et n'observent la régénération hépatique que par le prisme du poids du foie post hépatectomie, qui est un critère extrêmement grossier et de plus à un seul timing. L'unique conclusion possible de cette étude est que l'inhibition d'EGFR ne provoque pas un arrêt de la régénération hépatique sur le long terme, ce qui n'est pas en contradiction avec le reste de la littérature sur le sujet.

En effet, deux autres publications qui se sont également attachées à invalider directement l'EGFR dans le foie de modèles murins, ont permis de confirmer définitivement son rôle dans la régénération hépatique post hépatectomie. Chacune de ces études a observé un défaut majeur d'entrée en phase S des hépatocytes avec une inhibition de l'expression de la Cycline D1.

La première a consisté en une délétion spécifique au niveau du foie de l'EGFR. Celle-ci induisait un défaut de régénération post hépatectomie. De façon surprenante, aucune des voies en aval de l'EGFR n'a été trouvée diminuée. Seules les voies inflammatoires TNF- α et NF- κ B, puis p38 étaient dérégulées [206]. La deuxième étude a utilisé une technique d'ARN interférence pour supprimer l'expression d'EGFR. Cette dernière a donné le même phénotype de défaut de régénération hépatique sans pour autant trouver de voies en aval à incriminer. On peut uniquement noter la diminution de STAT3 au niveau transcriptionnel [228].

Dans les trois cas, comme dans la grande majorité des études d'invalidation de gènes impliqués dans la régénération, le foie est capable d'effectuer une régénération complète sur le long terme, mais les deux dernières études montrent une inhibition des phases précoces de la prolifération. Ceci suggère que l'EGFR régule spécifiquement la synchronisation de la transition G1/S des hépatocytes sans pour autant empêcher la restauration de la masse hépatique. De plus, étant données les divergences de résultats entre les études *in vitro* et *in vivo*, les voies contrôlant la régénération hépatique en aval de l'EGFR ne sont pas réellement identifiées.

Le rôle de l'EGFR dans le foie et au cours de la régénération hépatique a fait l'objet d'une revue dont je suis co-auteur et figurant en annexe.

Chapitre 5

La voie de signalisation TGF- β

5.1 Description générale de la voie TGF- β

Le TGF a été découvert en 1978 sur des cellules 3T3. Ces dernières infectées par le virus sarcome de Moloney produisaient des facteurs de croissance induisant un phénotype « transformé », se manifestant par une perte de croissance ainsi que la possibilité d'être cultivé sans le substrat utilisé [229]. Plus tard, on sépara les ligands TGF interagissant avec l'EGFR (TGF- α) ou pas (TGF- β) [230].

En réalité, il existe une véritable superfamille du TGF- β comportant 35 cytokines. Cette famille se subdivise schématiquement en deux sous-groupes distincts en fonction de leur similarité de séquence et des voies de signalisation que ces protéines activent. On note ainsi le premier groupe TGF- β /Activin/Nodal et le deuxième qui est constitué de Bone Morphogenetic Protein (BMP)/Growth and Differentiation Factor (GDF)/Muellerian Inhibiting Substance (MIS) (Figure 5.1). C'est essentiellement le premier groupe qui sera abordé ci-dessous.

La voie de signalisation TGF- β a de nombreux effets cellulaires parmi lesquels on peut noter l'inhibition de la prolifération, le contrôle de la différenciation cellulaire, la morphogénèse ou encore l'homéostasie tissulaire. Par ailleurs, la dérégulation de cette voie a été impliquée dans différentes maladies comme le cancer, les maladies cardiaques, l'asthme. Dans le foie, elle est particulièrement connue pour être inductrice de fibrose hépatique [232], pour intervenir dans la mise en place des canaux biliaires ou plus généralement dans la différenciation des hépatoblastes et le développement du foie [233].

Structurellement, tous les ligands de la famille TGF- β sont produits sous forme de précurseurs et contiennent dans leur région C-terminale la future cytokine mature. Celle-ci est un dimère stabilisé par des interactions hydro-

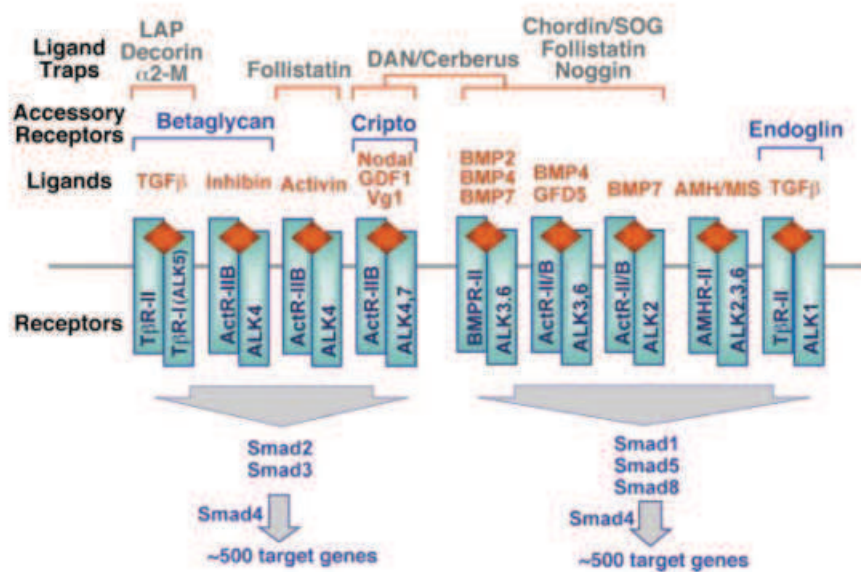


FIGURE 5.1 – La superfamille du TGF- β représentant les ligands, les récepteurs et les voies activées par chacun d’eux [231].

phobes et dont chaque monomère comporte 9 résidus cystéines. Les 8 premiers forment des ponts disulfures entre eux pour établir ce que l’on appelle un nœud de cystéines, tandis que le dernier crée un pont disulfure avec le deuxième monomère pour renforcer la structure finale [231]. Le ligand TGF- β comprend trois isoformes avec - β 1, - β 2 et - β 3 qui partagent 80% d’homologie de séquence protéique.

5.2 Le TGF- β dans le foie

Il existe trois formes de TGF- β chez la plupart des mammifères : TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. La délétion de TGF- β 1 n’est pas létale chez la souris mais entraîne une invasion de cellules mononuclées notamment dans le foie. A l’inverse, les KO de TGF- β 2 et TGF- β 3 meurent en période périnatale [234]. Ce sont les cellules de Kupffer ainsi que les cellules endothéliales qui ont été décrites comme exprimant le plus grand niveau de TGF- β 1 et de TGF- β 2 et 3 dans une bien moindre mesure. On observe des changements d’expression de TGF- β 1 dans différentes situations comme au cours de la régénération hépatique ou après une réponse fibrogénique [234].

Une fois synthétisé, le pro-TGF- β contient le Latency Associated Peptide (LAP) qui est lié à la protéine LTBP. Cette dernière présente des homologies

avec des constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène de type IV, la fibrilline ou encore la fibronectine. On explique ainsi que le complexe pro-TGF- β /LTBP se lie à la matrice extracellulaire au sein du foie, ce qui fournirait un réservoir de TGF- β disponible à tout moment sans avoir besoin d'une synthèse de novo. Les mécanismes contrôlant la maturation du pro-TGF- β en TGF- β sont nombreux. Parmi ceux-ci, on peut notamment citer l'uPA, les métalloprotéinases, la décorine ou encore la Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein (SPARC) [234]. Une fois sécrétée, le TGF- β va se lier à des récepteurs dimériques de types I et II à activité sérine/thréonine kinase. Ceci amène la formation d'un complexe tétramérique, induisant l'activation du domaine tyrosine kinase intracellulaire puis l'activation des protéines SMADs en aval. Il y a 8 protéines SMADs qui se catégorisent en « SMADS régulés par un récepteur » (R-SMADs), en « SMAD co-médiateurs » (co-SMAD) et en « SMADS inhibiteurs » (I-SMAD). Les R-SMADs (SMADs 1, 2, 3, 5 et 8) sont directement phosphorylés par leur récepteur, s'homodimérisent et forment un complexe avec la protéine co-SMAD (SMAD4) qui migre dans le noyau. Associés à d'autres facteurs nucléaires, ces complexes induisent la transcription d'un certain nombre de gènes cibles. Quant aux I-SMADs, (SMADs 6 et 7), ils agissent comme des antagonistes qui bloquent l'activation des R-SMADs ou co-SMADs pour réguler négativement la voie TGF- β . Les ligands TGF- β /Activin/Nodal se lient préférentiellement au récepteur de type II qui forme un hétérodimère avec le récepteur I et activent ensemble SMAD 2 et 3 alors que BMP/GDF/MIS interagissent davantage avec le récepteur de type I et phosphorylent SMAD 1, 5 et 8. Il existe un récepteur de type III dont le rôle principal est de moduler la disponibilité des ligands pour les deux premiers récepteurs [232]. Pour la suite de ce chapitre, c'est essentiellement la voie canonique TGF- β activant SMAD 2 et 3 et brièvement celle de l'activine qui seront traitées (Figure 5.2).

Dans la plupart des tissus, la voie TGF- β est principalement connue comme étant un inhibiteur de prolifération, en bloquant le cycle cellulaire en phase G1. Pour ce faire, elle induit la transcription d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes tels que p15 et la baisse d'expression de C-Myc [235]. Ceci entraîne ensuite une inhibition de la production de protéines du cycle cellulaire comme CDK2, CDK4 et les cyclines D1 et E [236]. On observe ensuite une diminution de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), qui devient capable de se lier à E2F et arrête ainsi le cycle cellulaire.

Le TGF- β est impliqué dans quatre mécanismes importants dans le foie adulte de réponse à une blessure. On note la fibrogénèse et trois autres processus faisant intervenir des notions de balance proliférative, l'apoptose, la carcinogénèse ainsi que la régénération qui fera l'objet du sous-chapitre V.3.

Le rôle antiprolifératif du TGF- β peut donc également passer par la mort

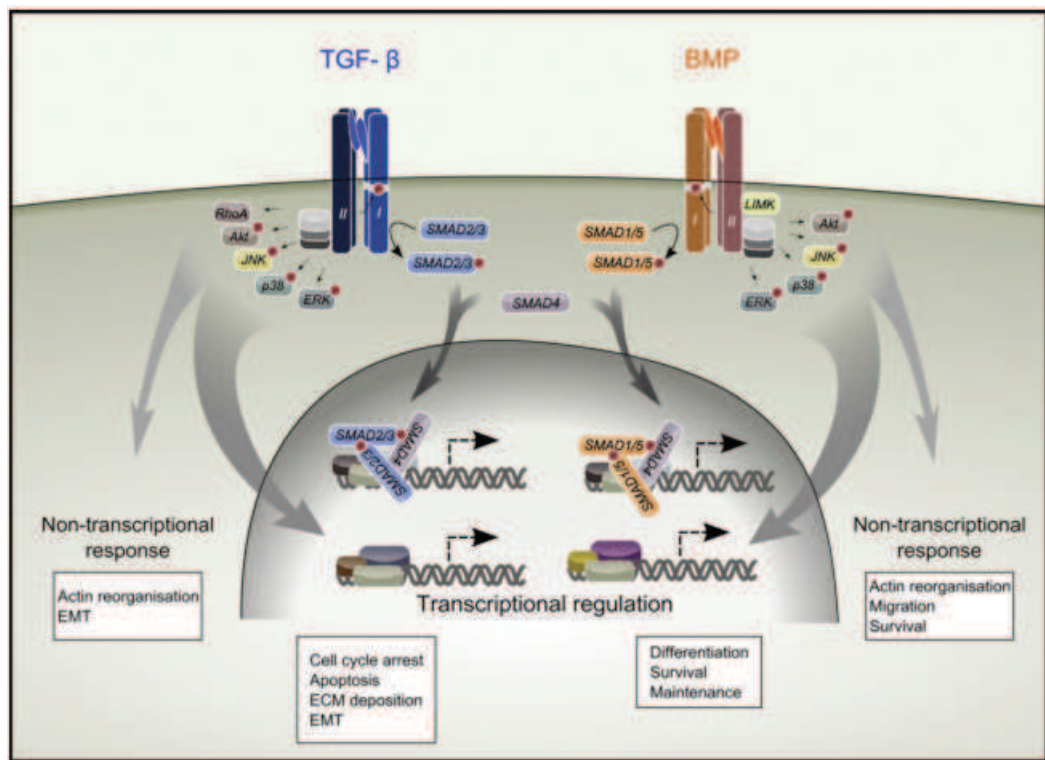


FIGURE 5.2 – La signalisation intracellulaire du TGF- β et de BMP. Les R-SMADs phosphorylés migrent vers le noyau pour activer différentes cibles. Alternativement, des voies de signalisation indépendantes des SMADs peuvent être activées par TGF- β et BMP [232]

cellulaire programmée. Ceci a été examiné *in vitro* sur des lignées d'hépatocytes humains Huh-7. Il a en effet été montré qu'en ajoutant du TGF- β à de très fortes doses, les hépatocytes répondaient en augmentant leur niveau de caspase-8, puis caspase-9 et -3 [237]. Par ailleurs, L'IL-6 a révélé un rôle inhibiteur de l'apoptose en bloquant la caspase-3 induite par le TGF- β , [238]. Sur ces lignées cancéreuses, l'activation de ces caspases est liée aux facteurs de transcription TIEG1 et TIEG2 [239]. Une autre donnée intéressante a montré que la capilline bloque l'apoptose induite par TGF- β [240]. Pour le moment, ce sont principalement des études *in vitro* qui ont montré l'importance du TGF- β pour induire l'apoptose des hépatocytes mais son mode d'action a besoin d'être davantage caractérisé.

Le TGF- β module également l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'initiation des tumeurs. Le niveau du TGF- β se trouve augmenté dans de nombreux carcinomes hépatocellulaires, ce qui est manifeste d'une résistance à l'effet antiprolifératif de ce dernier. L'analyse de patients présentant un carcinome hépatocellulaire révèle qu'une mutation du récepteur TGF- β intervient dans 50% des cas [241], tandis que des mutations de la voie activée en aval (telle que les SMADs) semblent beaucoup plus rares [242]. Même si beaucoup d'éléments restent à identifier dans ce processus, ces résultats montrent qu'une dérégulation de la voie TGF- β semble jouer un rôle dans le développement du carcinome hépatocellulaire.

5.3 Le contrôle de la voie de signalisation TGF- β sur la régénération hépatique

La voie de signalisation TGF- β a été soulignée comme étant inhibitrice de la prolifération hépatique au cours de la régénération et au delà, permettant le retour à la quiescence une fois la régénération effectuée. Les recherches autour de cette voie dans le cadre de l'hépatectomie partielle se sont principalement tournées vers la voie canonique TGF- β 1. En effet, après avoir observé le rôle antiprolifératif du TGF- β 1, ainsi que son plateau d'expression entre 48 et 72h post hépatectomie [154][243], on a cherché à davantage définir son rôle dans ce mécanisme en étudiant les différents acteurs de la voie. Récemment, certaines études ont commencé à s'intéresser au rôle de l'Activine, membre de la superfamille du TGF- β , dans la régénération hépatique. Cette voie, bien que clairement moins étudiée, sera abordée dans le dernier paragraphe.

5.3.1 Par le ligand TGF- β 1

Les premières expériences qui ont souligné le rôle du TGF- β 1 ont été menées *in vitro* sur des cultures d'hépatocytes de rats adultes. Il a été montré que l'ajout de TGF- β 1 inhibe la transition G1/S de ces hépatocytes. De façon intéressante, ce n'était pas le cas lorsque les auteurs ajoutaient du TGF- β 1 sur des lignées cancéreuses [244]. Des études ultérieures ont montré que le TGF- β empêchait également l'activation de l'HGF *in vitro* [245], participant ainsi au blocage de la transition G1/S. Une autre étude a observé la diminution de la protéine TGF- β partant de la région périportale des hépatocytes pendant la régénération hépatique, renforçant ainsi le rôle de ce ligand dans l'inhibition de la prolifération hépatique. Ces résultats étaient en corrélation avec une vague de prolifération des hépatocytes en provenance du même endroit [246]. D'autres expériences ont montré que l'injection de TGF- β 1 à des rats hépatectomisés induit un arrêt transitoire de la prolifération hépatique [247].

5.3.2 Par les récepteurs

Le récepteur de la cytokine TGF- β est composé de deux récepteurs de type I et II. L'implication de ce récepteur au cours de la régénération hépatique a suscité quelques interrogations. Ceci est venu de l'observation que les hépatocytes semblaient résistants au signal TGF- β pendant les premières heures d'hépatectomie. En effet, des hépatocytes isolés de rats hépatectomisés montraient une résistance accrue au TGF- β [248]. Une des explications proposées était que le récepteur au TGF- β diminuait directement après le signal d'hépatectomie partielle, rendant les hépatocytes insensibles à un quelconque signal [156]. Une autre étude montrait une up-régulation d'antagonistes Ski et SnoN qui se lient aux protéines SMADs et bloquent le signal dans les premières étapes de la régénération hépatique [249]. Il était alors postulé que ce mécanisme permettait aux hépatocytes de proliférer malgré la production de cette cytokine. L'étude de la délétion spécifique des récepteurs de type I et II a été rendue difficile du fait de leur létalité respectives [250]. Ultérieurement, afin de véritablement examiner le rôle de ce récepteur, une équipe a réalisé une délétion spécifique du récepteur de type II dans le foie. Après hépatectomie, le foie de ces souris présente une prolifération accrue des hépatocytes au cours de la régénération hépatique liée à une diminution de SMAD2 de la phosphorylation de la protéine p130, ainsi qu'une augmentation de la cycline E [251]. Une autre équipe est venue confirmer ces résultats avec une approche similaire. Cette fois, les auteurs ont noté une hyper-phosphorylation de la protéine Rb et une sur-activation des cyclines D1 et E. En revanche, la

fin de la régénération hépatique de ces souris n'est pas inhibée, sauf lorsque l'on ajoute un inhibiteur de l'activine A (la follistatine) [158].

Si ces études ne permettent pas de véritablement prouver le rôle du TGF- β dans la terminaison de la régénération hépatique, il semble clair aujourd'hui que cette voie représente un fort inhibiteur de la prolifération tout au long de la régénération. D'autre part, si les hépatocytes devenaient véritablement résistants au signal TGF- β directement après l'hépatectomie partielle, la délétion spécifique des récepteurs n'aurait aucune influence sur la prolifération. A la lumière de ces résultats, il semble plus raisonnable de penser que le TGF- β se trouve au milieu d'un ensemble de voies de signalisation contrôlant la prolifération hépatique finement. Ainsi, des voies pro-proliférantes (EGFR et C-Met) et anti-proliférantes (TGF- β et Activine) agissent comme des balances pour réguler le niveau de régénération hépatique. Puis, quand le TGF- β atteint son plateau maximum entre 48 et 72h, celui-ci prend le dessus et permet de stopper la prolifération des hépatocytes.

5.3.3 Quelques notions sur la voie de l'activine

La voie de l'activine appartient à la superfamille du TGF- β en faisant partie intégrante du premier groupe TGF- β /Activin/Nodal. Ainsi, le mode d'action et les voies de signalisation sous le contrôle de l'activine sont relativement semblables à celle du TGF- β , à la différence près qu'elles sont largement moins étudiées dans la régénération hépatique.

Le lien entre Activine A et régénération hépatique a été établi, par la délétion du récepteur TGF- β de type II. Cette étude avait montré une augmentation du signal de l'Activine A, permettant de compenser l'absence du récepteur. En effet, en ajoutant un inhibiteur de l'Activine - la follistatine - les auteurs observaient alors une augmentation importante de la prolifération post hépatectomie [158]. D'autre part, il a en effet été montré que l'Activine A inhibait la prolifération des hépatocytes *in vitro* [252] en induisant Sp1, lui même contrôlant la transcription de p15 [253]. Par ailleurs, l'Activine A est exprimée après le signal d'hépatectomie partielle et l'injection de follistatine à des rats hépatectomisés accélère la régénération hépatique, même si elle s'achève normalement [254]. On peut noter également que l'injection d'un adénovirus exprimant la follistatine sur des foies de rats adultes induit une hépatomégalie par prolifération hépatocytaire, suggérant par ailleurs un rôle de cette voie dans le maintien de la quiescence des hépatocytes [255]. Enfin, une étude a également montré que des hépatocytes fœtaux (FLPC pour *Fetal Liver Progenitor Cells*) participent 4 à 5 fois plus à la repopulation du foie s'ils sont transplantés dans des foies de souris âgés plutôt que jeunes. En effet, le signal de l'Activine A augmente avec l'âge, diminuant ainsi les ca-

pacités prolifératives des hépatocytes. Cependant, les FLPC présentent une diminution des récepteurs de l'Activine A, les rendant insensibles à ce signal, et leur conférant un avantage prolifératif [256].

Aujourd'hui, il manque un certain nombre d'études pour confirmer le rôle de l'Activine A post hépatectomie partielle. Ceci dit, de plus en plus d'articles semblent souligner son importance dans le contrôle de la prolifération. Il apparaît toutefois que l'inhibition concomitante de la voie de signalisation du récepteur au TGF- β 1 et de l'activine A soit nécessaire pour supprimer le signal de terminaison de la régénération hépatique.

Deuxième partie

OBJECTIFS ET TRAVAUX

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse à la compréhension des mécanismes contrôlant la régénération hépatique, en particulier dans le cadre de l'hépatectomie partielle. Dans ce contexte, mon travail de doctorat s'est principalement focalisé sur une voie de signalisation moléculaire, la voie de l'hormone de croissance, afin d'expliquer les défauts de régénération hépatique dans un contexte pathologique, celui de la stéatose hépatique. La dérégulation de l'hormone de croissance est en effet observée dans différentes conditions physiopathologiques, notamment au cours du vieillissement, situation également génératrice de défaut de régénération, et en particulier en cas d'obésité et de stéatose hépatique.

A mon arrivée au laboratoire, J'ai participé à la fin d'un travail en cours visant à identifier les mécanismes moléculaires qui présidaient au contrôle du défaut de régénération hépatique lors du blocage de la voie de la signalisation de l'hormone de croissance. Une dérégulation de la voie de l'EGFR ayant été identifiée lors de ce travail, l'hypothèse a donc été émise qu'une telle dérégulation pouvait également être à l'origine du défaut de régénération hépatique du foie stéatosique. Puisque cette première étude s'inscrit pleinement dans les prérequis qui ont abouti à l'hypothèse de travail de mon projet de doctorat, il m'a semblé important d'en expliquer la démarche.

Ainsi, j'aborderai dans une première partie les principales fonctions de la voie de l'hormone de croissance ainsi que les travaux ayant permis d'identifier l'EGFR comme un relais de la voie de la GH nécessaire à la régénération du foie (**publication n°1**), puis dans une seconde partie, mon projet de doctorat personnel sur l'implication des altérations de cette voie dans les défauts de régénération du foie stéatosique (**publication n°2**).

Chapitre 6

Le contrôle de l'hormone de croissance sur la régénération hépatique

Il existe de nombreuses mutations qui n'ont que peu ou pas d'impact sur la régénération hépatique après hépatectomie. Comme je l'ai décrit dans l'introduction de ce manuscrit, les redondances ou encore le très grand nombre de voies de signalisation impliquées dans ce phénomène, préviennent la majorité des dérégulations que l'on s'attendait initialement à observer. Dans la plupart des cas, un simple retard de la régénération est constaté, caractérisé par un décalage dans le temps du pic de synchronisation d'entrée en phase S des hépatocytes. Ces études d'invalidation génique ont malgré tout permis de déchiffrer des voies essentielles de ce mécanisme, de comprendre certaines interconnexions existant entre elles, de les hiérarchiser et de comprendre comment elles fonctionnaient, afin de décliner le processus de régénération hépatique en différentes étapes. Ainsi, beaucoup de recherches avaient à ce jour simplement souligné l'importance de certaines voies moléculaires sans véritable explication mécanistique. Ceci a notamment été le cas avec l'hormone de croissance (GH) qui avait par le passé été décrite comme contrôlant la régénération hépatique après hépatectomie sans que les voies en aval aient été identifiées. L'objectif de la première partie de cette étude a donc été de décrypter les voies modulées par l'hormone de croissance pour contrôler la régénération hépatique.

6.1 Concepts généraux sur l'hormone de croissance

L'hormone de croissance aussi appelée somatotropine, est une hormone peptidique composée de 191 acides aminés de 4 hélices et de deux ponts disulfures. Bien que ses fonctions soient nombreuses sur l'organisme, elle a au départ été décrite et est toujours principalement connue, pour stimuler la croissance. Elle est exprimée par des cellules spécialisées nommées somatotropes de la partie antérieure de l'hypophyse. Sa transcription est régulée par un certain nombre de facteurs de transcription, parmi lesquels on peut citer *pituitary specific transcription factor 1* (Pit-1), *specificity protein 1* (Sp1), *activator protein-2* (AP-2), *nuclear factor-1* (NF-1) et *upstream stimulating factor* (USF) [257]. Son rôle est pléiotrope sur l'organisme en jouant sur des effets à la fois directs et indirects, la plupart liés au métabolisme, à la croissance et la prolifération cellulaire. Elle est essentiellement connue comme l'hormone responsable de la croissance post-natale via, comme on le verra, l'activation d'IGF-1.

6.1.1 La transduction du signal de l'hormone de croissance

De façon générale, l'hormone de croissance se fixe sur deux récepteurs cytokiniques spécifiques formant le récepteur (GHR), présents dans la quasi-totalité des tissus. Ceci entraîne un changement de conformation des récepteurs et mène à l'activation de voies de signalisation différentes.

Ce changement de conformation provoque la phosphorylation d'une première molécule de Janus Kinase 2 (Jak2) qui induit immédiatement l'activation d'une seconde molécule Jak2 adjacente par trans-phosphorylation [258][259]. Ceci va conduire à une série de phosphorylations dans la région cytoplasmique du GHR [260] pour mener à l'activation de protéines en aval de Jak2, en particulier les Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs), dont STAT1, STAT3, STAT5A et en grande majorité dans le foie STAT5B. Grace à des études utilisant des souris pour lesquelles certaines parties intra-cytoplasmiques du GHR avaient été mutées, il a été montré que STAT5 se liait directement au récepteur pour s'activer, contrairement aux autres STATs qui se lient à Jak2 [261]. L'ensemble des STATs s'active par phosphorylation, ce qui permet leur homo- ou hetero-dimérisation. Ceci va ensuite induire leur translocation dans le noyau et la transcription d'un certain nombre de gènes cibles par fixation sur des séquences spécifiques situées dans les promoteurs et activateurs de ces derniers. Parmi ces nombreuses

cibles, on peut notamment citer l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1), l'Acid Labile Subunit (ALS), le Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2) et l'Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) [262]. Ces cibles interviennent toutes les quatre, directement ou non sur l'activité d'IGF-1. Jak2 est également capable d'induire l'activation de la voie PI3K/mTOR par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine adaptatrice Insulin receptor substrate-1 (IRS-1). De même, via les adaptateurs SHC, GRB et SOS, la voie Jak2 peut mener à l'activation de la voie des MAPK [263][264] (Figure 6.1).

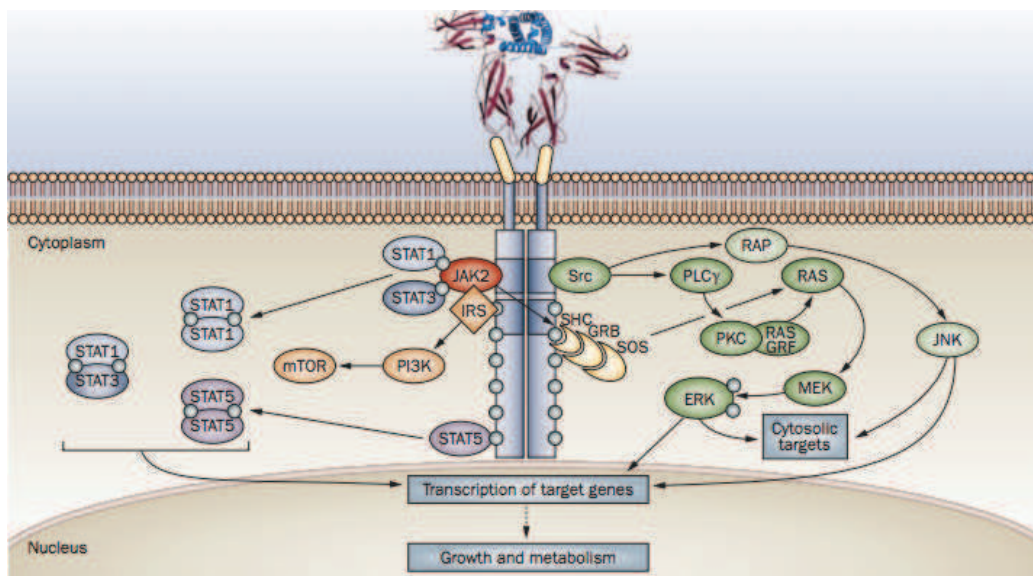


FIGURE 6.1 – Les voies de signalisation activées par l'hormone de croissance [262]. Les voies de signalisation activées en aval du récepteur GHr passent par l'activation de Jak2 ou de Src. Jak2 mène à l'activation des protéines STATs qui se lie avec elle (STAT1-3) ou au récepteur GHr phosphorylé par Jak2. Jak2 est également responsable de l'activation de la voie PI3K par l'intermédiaire de la phosphorylation d'IRS. Src induit l'activation des MAPK par l'intermédiaire de PLC γ ou des protéines adaptatrices SHC, GRB et SOS, ainsi que de la voie Jnk.

Il existe au moins deux autres voies de signalisation activées par l'hormone de croissance de façon indépendante de Jak2. Le GHr peut en effet interagir avec la kinase Src. Par l'intermédiaire de la phospholipase C γ , ceci va mener à l'activation de la voie des MAPK. En effet, en utilisant cette fois une lignée de souris mutées sur la région intra-cytoplasmique du GHr, responsable de l'activation de la voie Jak2/STATs mais n'interférant pas avec l'activation

de Src, la même équipe a pu montrer *in vivo* l'activation de la voie Src/Erk indépendamment de Jak2 et observer les cibles différemment activées entre les deux grandes voies [265]. On sait par ailleurs que Src est également capable d'induire l'activation de la voie des c-Jun N-terminal kinases (JNKs) [266] (Figure 6.1).

L'activation de chacune de ces voies dépend également du tissu cellulaire. Dans le foie, la voie principalement activée par le signal de l'hormone de croissance est la voie Jak2/STATS.

6.1.2 Régulation de l'hormone de croissance

La production d'hormone de croissance est contrôlée par deux autres hormones en provenance de l'hypothalamus. L'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH), aussi appelée somatolibérine déclenche la sécrétion d'hormone de croissance, alors que la « Growth hormone inhibiting hormone » (GHIH), autrement nommée somatostatine ou SRIF, l'inhibe (Figure 6.2).

Il existe donc un contrôle assez fin de la sécrétion d'hormone de croissance puisque la diminution de la glycémie [267], l'augmentation de certains acides aminés présents dans le sang [268], ou encore le stress [269] vont contrôler positivement la production d'hormone de croissance. A l'inverse, l'augmentation de la glycémie et la diminution de ces mêmes acides aminés fait chuter la production d'hormone de croissance. On sait aujourd'hui que ces effets sont médiés via la GHRH et la GHIH. Il existe également un rétrocontrôle négatif de l'hormone de croissance via la production hépatique d'IGF-1 auparavant appelé somatomédine. Au final, les interactions entre la GHRH, la GHIH et l'IGF-1 induisent une sécrétion pulsatile de l'hormone de croissance, qui chez l'Homme se produit toutes les 2h. On note également qu'en raison de l'hypoglycémie nocturne, les plus grands pics de sécrétion de l'hormone de croissance se produisent pendant la période de sommeil [270].

Par ailleurs, il a été montré que les hormones gonadiques, telles que la testostérone ou l'estradiol stimulent la sécrétion d'hormone de croissance. Ce phénomène est très certainement responsable de l'augmentation de l'hormone de croissance observée au cours de la puberté. A l'inverse, l'hormone de croissance est connue pour diminuer progressivement au cours du vieillissement. Par analogie avec la ménopause ou l'andropause, on appelle ce phénomène « somatopause » [272].

Parmi les pathologies induites par une anomalie de sécrétion d'hormone de croissance chez l'enfant, on trouve l'acromégalie, qui est induite par une trop grande sécrétion d'hormone de croissance, le plus souvent provoquée par

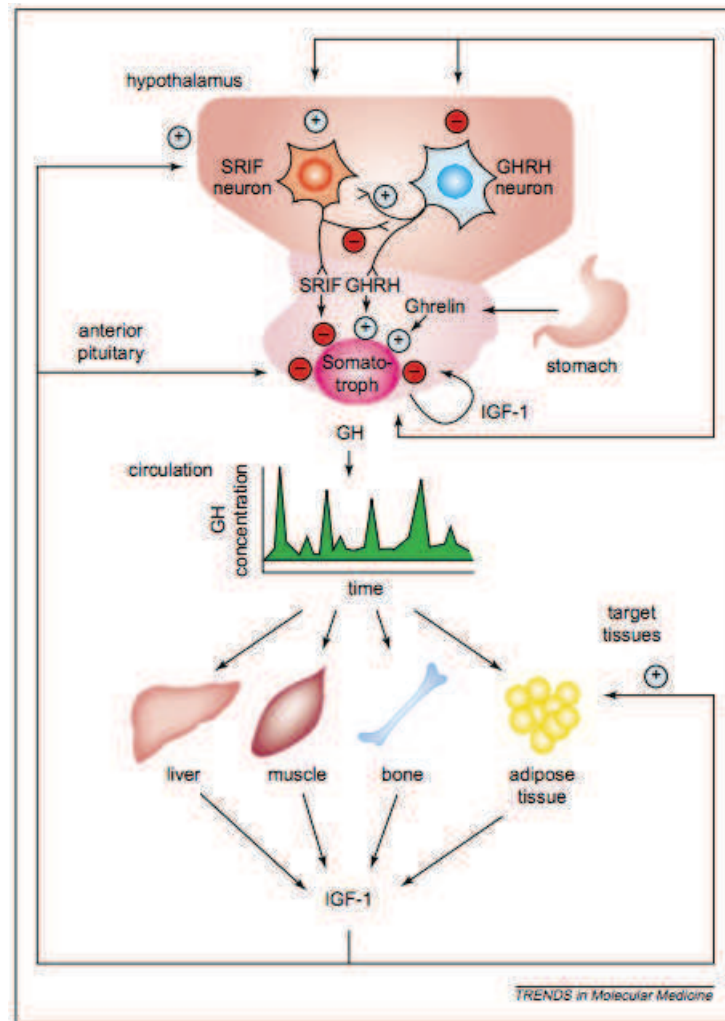


FIGURE 6.2 – Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance [271]. La GHIH (SRIF) et la GHRH contrôlent directement les sécrétions d'hormone de croissance au niveau hypothalamique. Une fois sécrétée, l'hormone de croissance active un certain nombre de cibles dans le foie dont l'IGF-1. L'IGF-1 agit ensuite comme un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'hormone de croissance.

un adénome hypophysaire et qui se manifeste progressivement par une augmentation de la taille des extrémités comme les mains ou encore le visage. À l'inverse, le nanisme harmonieux vient d'un défaut d'hormone de croissance. Il existe également un syndrome d'insensibilité à l'hormone de croissance, aussi appelé Syndrome Laron, du nom de celui qui l'a décrit en 1966 [273]. Ce syndrome se caractérise par un nanisme semblable à celui observé dans le cas d'une déficience en hormone de croissance, mais avec des taux d'hormone de croissance normaux voir supérieurs à la moyenne. On observe néanmoins une diminution de l'IGF-1 et de l'IGFBP-3. Ce type de nanisme est associé à un déficit du récepteur de l'hormone de croissance (GHR), mais a également été décrit chez des patients présentant un déficit en STAT5 [274].

De façon surprenante, le défaut de signalisation d'IGF-1 induit une augmentation de la durée de vie sur différents modèles, comme sur *C.elegans* [275] ou sur la souris [276]. Les Hommes atteints d'une déficience en hormone de croissance semblent aussi protégés contre les maladies liées au vieillissement. Une étude parue en 2011 a notamment suivi des patients équatoriens présentant une mutation au niveau du récepteur de l'hormone de croissance pendant 22 ans. Ils ont ainsi montré que ces patients vivaient plus longtemps et présentaient une fréquence moindre de diabète et de cancers [277].

6.1.3 Les rôles de l'hormone de croissance

Des effets directs et indirects

L'hormone de croissance possède à la fois des effets directs et indirects sur l'organisme. Ses effets directs sur l'organisme jouent sur le métabolisme protéique, glucidique et lipidique. Pour ce faire, elle agit à la fois sur l'ensemble des cellules et sur le tissu adipeux.

Dans le premier cas, elle joue principalement sur le métabolisme protéique en favorisant l'entrée dans les cellules des acides aminés présents dans le sang et en augmentant la synthèse protéique. De plus, elle inhibe aussi la dégradation protéique des cellules. Ce mécanisme sur les cellules entraîne un rétrocontrôle négatif sur l'hormone de croissance. En effet, tout ceci amène à une diminution des acides aminés présents dans le sang, ce à quoi va pouvoir répondre la GHIH en diminuant la sécrétion d'hormone de croissance.

Dans le second cas, elle va induire la lipolyse des acides gras présents dans le tissu adipeux [278]. Ces derniers vont être métabolisés et relargués dans la circulation sanguine, ce qui amène à une augmentation de la glycémie. Encore une fois, cette hausse de glucose sanguin va agir en rétrocontrôle négatif sur la GHIH qui inhibera la sécrétion d'hormone de croissance.

L'essentiel des fonctions indirectes de l'hormone de croissance est médié

via l'IGF-1 circulant, synthétisé initialement dans le foie. Dans les années 70, il avait été proposé que l'IGF-1 était le médiateur par défaut de l'hormone de croissance et avait un effet direct sur différents organes [279]. Grâce à des études d'invalidation d'IGF-1 dans différents tissus, on sait aujourd'hui que ce facteur est majoritairement synthétisé par le foie, mais peut également venir d'autres organes, notamment le muscle [280]. De plus, il fonctionne en grande majorité en formant un complexe de trois protéines avec l'ALS et les IGF-Binding Proteins (IGFBPs), qui vont permettre de stabiliser l'IGF-1 dans le sang et de moduler son activité sur différents tissus. L'IGF-1 joue en particulier sur la croissance des muscles, des cartilages et des os. Le rôle prépondérant de l'IGF-1 dans le contrôle de la croissance du système musculo-squelettique est effectivement connu depuis longtemps. Il y a une vingtaine d'années, on avait montré que sa délétion entraînait une ostéopénie ainsi qu'une hypoplasie musculaire [280]. Puisque la contraction d'un muscle induit une pression importante sur les os, la croissance de l'un comme de l'autre doit être parfaitement adaptée. Parmi ces nombreux effets, l'IGF-1 induit une augmentation de la taille des chondrocytes [281] et la maturation des ostéoblastes [282]. Concernant les cellules musculaires, l'IGF-1 augmente en particulier le métabolisme énergétique [283] et stimule la fusion des myocytes [284].

Les effets physiologiques et métaboliques de l'hormone de croissance

Les actions à la fois directes et indirectes de l'hormone de croissance lui garantissent des effets physiologiques et métaboliques sur de nombreux tissus. Une vue d'ensemble de ces effets est résumée sur la Figure 6.3. Néanmoins, pour plus de simplicité, nous aborderons les effets de l'hormone de croissance sur ses principaux organes cibles, à savoir le foie, le tissu adipeux et musculaire squelettique.

Dans le foie

L'hormone de croissance joue essentiellement sur le métabolisme glucidique et lipidique dans le foie. L'hormone de croissance stimule notamment la production de glucose, bien qu'on ignore encore si elle agit principalement via l'activation de la gluconéogenèse ou de la glycogénolyse. En effet, l'injection de fortes doses d'hormone de croissance sur des adultes stimule la glycogénolyse [285], tandis que des injections en sous-cutané pendant une semaine induisent la gluconéogenèse [286]. L'hormone de croissance joue également sur le captage du glucose par le foie. Ceci a été montré en surexprimant l'hormone de croissance humaine chez les rats [287] ou encore en utilisant

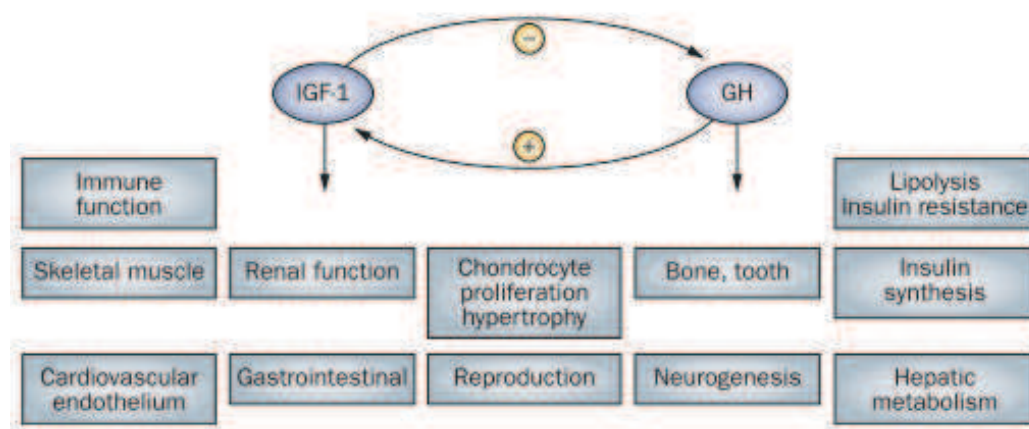


FIGURE 6.3 – Les actions majeures de l’hormone de croissance par l’intermédiaire ou non de l’IGF-1 [262] L’hormone de croissance utilise STAT5 pour induire à la fois l’IGF-1 et beaucoup de ses actions directes. Il est donc difficile de différencier les actions directes de l’hormone de croissance, de celles qui passent par l’IGF-1. Cependant, les actions que l’on attribue à l’hormone de croissance de façon directe sont placées schématiquement sur la droite et celle de l’IGF-1 sur la gauche.

un antagoniste de l’hormone de croissance sur des patients présentant une acromégalie [288]. Ainsi, le rôle de l’hormone de croissance sur le glucose s’effectue à la fois au niveau de la production que du captage de ce dernier.

Il a par ailleurs été montré que la déficience en hormone de croissance diminue l’expression de la lipase hépatique, que la surexpression d’hormone de croissance bovine augmente le niveau de lipoprotéine lipase (LPL) [289]. In vitro sur des cellules HepG2, l’hormone de croissance stimule la phosphorylation de SREBP-1a [290]. Ces différentes expériences montrent que l’hormone de croissance joue non seulement un rôle très important dans le métabolisme lipidique en favorisant le captage des acides gras, mais qu’elle stimule aussi la sécrétion de ces derniers. Les souris mutées pour le récepteur de l’hormone de croissance spécifiquement dans le foie développent une stéatose hépatique qui n’est pas corrigée par la surexpression adénovirale d’IGF-1 [291]. Le même phénotype est observé pour les souris dont STAT5 ou encore Jak2 sont délétés spécifiquement dans le foie [84][292]. Ainsi, les effets de l’hormone de croissance sur le foie sont principalement la production de glucose ainsi que son captage, et la sécrétion des acides gras et leur captage.

Il est également intéressant de noter que l’hormone de croissance a été impliquée dans la régulation du métabolisme des xénobiotiques. En effet, en utilisant des souris mutées pour le gène du récepteur de la GHRH, des auteurs ont montré une augmentation de l’activité de FXR et de ses cibles. Ils

expliquent ainsi que l'implication de l'hormone de croissance dans la détoxification, pourrait être responsable de l'augmentation de la durée de vie des animaux dépourvus d'hormone de croissance par le biais de l'augmentation de FXR [293].

Dans le tissu adipeux

L'hormone de croissance stimule la lipolyse dans le tissu adipeux, en particulier dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané [294]. Il a ainsi été montré à la fois chez l'Homme et chez la souris que l'hormone de croissance induisait une augmentation de l'activité de la lipase hormone-sensible (HSL), probablement via le récepteur β -adrénergique [295][296]. L'hormone de croissance pourrait aussi induire la lipolyse par l'expression de la Cell death activator (CIDE-A), une protéine jouant sur la concentration des gouttelettes lipidiques. En effet, les souris délétées pour le récepteur de l'hormone de croissance présentent un déficit en CIDE-A dans le tissu adipeux sous-cutané [297]. Parmi les autres cibles de l'hormone de croissance dans le tissu adipeux pour induire la lipolyse, on peut citer la 11β -hydroxystéroïde deshydrogénase de type 1 (11β -HSD1), une enzyme régulant l'action des glucocorticoïdes [298].

Dans le tissu musculaire squelettique

L'hormone de croissance induit le captage des acides gras dans le tissu musculaire squelettique à des fins énergétiques. Cette action s'effectue via l'augmentation de l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL), qui est l'enzyme limitante de la synthèse des triglycérides et participe à leur hydrolyse en acides gras [299][300]. Elle permet ainsi de fournir le tissu musculaire squelettique en lipides. L'hormone de croissance induit également la lipase hormono-sensible (HSL) dans le tissu musculaire squelettique [301]. L'injection d'hormone de croissance sur des souris qui en sont déficientes a montré l'expression de PPAR β/δ , un acteur important du métabolisme lipidique [302]. D'autre part, l'hormone de croissance induit la synthèse de triglycérides dans le tissu musculaire squelettique à des fins de stockage [301][303]. Pour ce faire, le muscle estérifie à nouveau les acides gras libres en triglycérides. Ainsi, l'action musculaire de l'hormone de croissance joue essentiellement sur le métabolisme lipidique plutôt que glucidique. Elle induit le captage des acides gras libres ainsi que la synthèse de triglycérides. Certains de ses effets semblent être indépendants du signal IGF-1 [299], suggérant une action à la fois directe et indirecte de l'hormone de croissance sur le muscle squelettique.

6.2 L'implication de l'hormone de croissance au cours de la régénération hépatique

Il y a plus d'un demi siècle que certaines études ont souligné le rôle potentiel de l'hormone de croissance sur la régénération hépatique. Les premières expériences ont été effectuées en injectant de l'hormone de croissance en sous-cutané sur des rats après hépatectomie. Les hépatocytes de ces derniers présentaient un plus grand pic de synthèse d'ADN que les hépatocytes contrôles et démarraient la mitose avec 1h d'avance [304]. D'autres équipes ont utilisé un modèle de rat dont on avait retiré l'hypophyse pour observer que ceux ci présentaient un défaut majeur de régénération hépatique après hépatectomie, qui était alors corrigé par injections d'hormone de croissance [305]. Plus tard, une équipe a utilisé deux modèles murins invalidant la voie de signalisation de l'hormone de croissance, l'un portant des délétions à la fois d'IGF-1 et d'ALS et l'autre exprimant un antagoniste de l'hormone de croissance (GHa). Après hépatectomie, les deux séries d'animaux présentaient un retard de prolifération hépatocytaire, une diminution drastique du pic de prolifération n'étant noté que dans le modèle GHa [306]. Ces résultats semblaient indiquer que la majeure partie du contrôle de l'hormone de croissance sur la régénération hépatique ne passe pas via IGF-1, inhibé dans les deux cas. Pourtant, il a été montré que la mutation du récepteur de l'IGF-1 conduit à un défaut de régénération après hépatectomie partielle [150], laissant entrevoir le rôle d'IGF-1, en aval de l'hormone de croissance dans le défaut de régénération post-hépatectomie. Pour concilier les deux types d'expériences, on peut suggérer qu'IGF-1 n'a qu'un effet modéré sur la régénération hépatique et donc ne pourrait médier qu'une partie des effets de l'hormone de croissance dans ce processus.

Ainsi, même si un certain nombre d'études soulignaient déjà l'importance de l'hormone de croissance dans le contrôle de la régénération hépatique chacun des modèles présentaient des faiblesses : le modèle d'hypophysectomie étant trop drastique, ne permet pas d'exclure l'implication d'autres hormones (notamment la prolactine) ; quant au modèle murin qui surexprime le GHa, il ne permet pas d'obtenir une inhibition totale du signal de l'hormone de croissance. La deuxième limitation de ces études est qu'aucune d'entre elles ne décrypte moléculairement le contrôle de l'hormone de croissance sur la prolifération hépatocytaire.

D'autre part, quelques études se sont concentrées sur les pertes des capacités prolifératives des hépatocytes de souris âgées en s'intéressant à la diminution de l'hormone de croissance dans ce cadre. En effet, au cours du vieillissement, on observe une somatopause et on sait que l'injection d'hor-

l'hormone de croissance permet de corriger certains défauts liés au vieillissement. On remarque notamment des effets sur la prolifération cellulaire ou encore la masse musculaire, à la fois sur modèle murins [307] et sur l'Homme [308]. Les hépatocytes de souris âgées présentent un défaut de régénération après hépatectomie partielle. De façon intéressante, il a été montré que l'injection d'hormone de croissance chez les souris âgées permet de restaurer ce phénotype, par l'intermédiaire du facteur de transcription Forkhead Box m1b (Foxm1b) [309]. Depuis, une équipe a mis en évidence un complexe protéique (C/EBP α -HDAC1-Brm), habituellement inhibé par l'hormone de croissance, qui se forme chez la souris âgée et bloque la transcription de cibles telles que Foxm1b [310]. Une autre équipe a montré que FXR, indispensable à la régénération hépatique, avait pour cible Foxm1b [311]. Plusieurs années auparavant, il avait été établi que l'absence d'hormone de croissance réduisait le niveau des acides biliaires, ouvrant la voie vers une voie GH-FXR [312]. Ces résultats dégagent à nouveau certaines pistes d'études quant à la mécanistique de l'axe de l'hormone de croissance sur la régénération hépatique. Cependant, aucun consensus sur les voies moléculaires en aval ne ressort de ces travaux.

6.3 Publication n°1 : Le récepteur de l'hormone de croissance joue un rôle majeur au cours de la régénération du foie en contrôlant l'EGFR et l'activation de Erk1/2

6.3.1 Synthèse

Au cours de cette étude, nous avons cherché à identifier les voies moléculaires modulées par le défaut de l'hormone de croissance au cours de la régénération hépatique. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de souris dépourvu en récepteur de l'hormone de croissance GHRKO, aussi appelé nanisme type Laron. Il s'agit d'un excellent modèle pour étudier les effets de l'hormone de croissance puisque ces souris présentent une inhibition complète de la voie, caractérisée par une extension de la durée de vie ainsi qu'une inhibition partielle de la croissance post-natale. En conséquence, les adultes sont approximativement deux fois plus petits que leurs contrôles respectifs. Nous avons pratiqué des hépatectomies des deux tiers sur ces souris pour confirmer le défaut de régénération associé à la voie de l'hormone de croissance. Nous nous sommes ensuite intéressés à décrypter les différentes phases précoces de la régénération hépatique contrôlant le cycle cellulaire des hépatocytes

jusqu'à la transition G1/S. Nous avons donc analysé la phase de priming, la phase métabolique et la phase des facteurs de croissance.

Il avait notamment déjà été suggéré par différentes approches qu'il existait un contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel de l'hormone de croissance sur l'EGFR. En effet, plusieurs équipes ont mené à la fin des années 80 des expériences sur des souris dont on avait préalablement enlevé l'hypophyse, ainsi que sur des modèles partiellement déficients en hormone de croissance [313][314]. Ces études avaient conclu à une absence transcriptionnelle d'EGFR sur ces souris, ce qui pouvait être corrigé en injectant de l'hormone de croissance. Plus tard, un laboratoire a utilisé un modèle transgénique pour l'hormone de croissance pour observer l'augmentation d'un certain nombre de voies de signalisation. Parmi celles-ci se trouvait l'EGFR qui voyait son niveau basal augmenté par rapport aux contrôles [315]. Récemment, une étude s'est attachée à observer les effets d'injections d'hormone de croissance sur deux modèles d'absence ou de surexpression de la voie. Le premier modèle consistait en la délétion du récepteur (GHRKO) et révélait une diminution de l'expression d'EGFR ainsi que de l'activation des voies en aval de ce dernier. A l'inverse, le deuxième modèle utilisant une souris transgénique (GH-Tg) montrait une surexpression de l'EGFR avec une suractivation de certaines voies en aval [316].

Il avait par ailleurs été observé que l'hormone de croissance contrôlait également l'activation de l'EGFR, donc au niveau post-transcriptionnel. En effet, des expériences sur des cellules hépatiques *in vitro* ont permis de révéler que l'hormone de croissance, via JAK2 contrôle la phosphorylation de l'EGFR sur les tyrosines 845, 992, 1068, et 1173 [317][318]. De plus, l'hormone de croissance est également capable de phosphoryler l'EGFR sur des résidus thréonines, ce qui augmente sa stabilité et réduit ainsi son cycle de dégradation [319]. Ainsi, l'hormone de croissance participe également, par voie indirecte, à la stabilité protéique de l'EGFR. Aucune étude ne s'était pourtant intéressée à étudier les liens entre hormone de croissance et EGFR au cours de la régénération hépatique

Inserm, U1016, Institut Cochin (A.Z.-S., M.L.-B., C.M., A.C.H., V.B., F.C., A.S., H.G., J.-E.G.); and CNRS, UMR8104 (A.Z.-S., M.L.-B., C.M., A.C.H., V.B., F.C., A.S., H.G., J.-E.G.); and Université Paris Descartes (A.Z.-S., M.L.-B., C.M., A.C.H., V.B., F.C., A.S., H.G., J.-E.G.), 75014, Paris, France; CNRS UMR 7592 (H.B.), Institut Jacques Monod, and Université Paris Diderot (H.B.), 75013, Paris, France; Edison Biotechnology Institute (J.J.K.), Molecular and Cellular Biology Program, Ohio University, Athens, Ohio 45701; and Department of Molecular and Cellular Biology (L.L., J.X.), Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030

It has been known for decades that the liver has the capacity to regenerate after an injury. The most commonly used model to investigate liver regeneration in rodents is a two thirds partial hepatectomy (PH). After this surgical procedure, hepatocytes, which are highly differentiated, and quiescent cells reenter the cell cycle and restore the initial hepatocyte mass after one to two rounds of replication (1). Two sequential and tightly controlled steps are required for the synchronous entry of hepatocytes into the cell cycle. First, there is an initial priming phase, in which the activation of IL-6 and TNF α pathways allows the

GH is a pivotal hormone in the regulation of postnatal growth and metabolism of carbohydrates, proteins, and fat. GH receptor (GHR) belongs to the cytokines receptor superfamily and induces the activation of the JAK2 ty-

Abbreviations: BrdU, Bromodeoxyuridine; EGFR, epidermal growth factor receptor; GHR, GH receptor; GHRKO, GHR knockout; HB-EGF, heparin-binding EGF; HGF, hepatocyte growth factor; IGFBP, IGF-binding protein; PH, partial hepatectomy; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAT, signal transducer and activator of transcription; WT, wild type.

rosine kinase in response to GH. In the liver, activated JAK2 phosphorylates GHR target genes, resulting in the activation of four major pathways: Ras/MAPK/ERK, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, signal transducer and activator of transcription (STAT)3, and the somatotrope axis (STAT5/IGF-1). This activation has pleiotropic effects especially on proliferation, differentiation, and metabolism. More recently, it has been demonstrated that GH also triggers a Src-mediated, JAK-2 independent signaling cascade that could also activate ERK (2). All of these pathways are involved in cell proliferation.

The first evidence that GHR signaling plays a major role in regeneration of the liver came from studies on hypophysectomized rats that showed delayed regeneration after PH (3). Recently, an inhibition of the GH pathway has also been reported during the progression from fibrosis to cirrhosis (4, 5), which is also characterized by a reduced hepatocyte proliferation capacity (6–8). The decline of GH production with age has also been associated with the age-related reduction in proliferation capacity of hepatocytes, which is reversed, after GH administration to old mice (9, 10). Finally, a transgenic mouse model expressing a GHR antagonist that blocks GH action showed impaired liver regeneration after PH (11). However, the molecular pathways modulated by GH during the liver regeneration process remained to be unveiled.

In contrast with transgenic mice expressing a GH antagonist, GHR knockout mice (GHRKO), also called Laron dwarf mice, show a complete inhibition of the GH pathway with an increased lifespan and a reduced postnatal growth, the adults reaching approximately half the size of the controls (12). The complete impairment of GH signaling observed in GHRKO mice is therefore a better model for studying the role of this signaling pathway in liver regeneration. These KO mice have elevated levels of circulating GH and a near total suppression of circulating IGF-1 (13). However, they do not display any liver phenotypic abnormalities. In this study, we show that liver regeneration is severely delayed in mutant GHRKO adult mice, and we identify EGFR and Erk1/2 as the main downstream targets of the GHR pathway involved in the observed phenotype.

Materials and Methods

Mice and manipulation

GHRKO mice, 8–10 wk old, and control littermates [wild type (WT)] were kept on a 12-h light, 12-h dark cycle with free access to food and water. GHRKO GHRKO/Tg-IGF-1 and WT mice were littermates obtained from the breeding of GHR^{+/–} heterozygous mice (Sv129Ola background) (13) with IGF-1 heterozygous transgenic mice (C57/Bl6 background) (14). GHR^{+/–} heterozygous mice were obtained from J. Kopchick (Athens, OH), and IGF-1 transgenic mice were

obtained from J. Xu (Houston, TX). Four to six male mice were used in each group and for each time point (total $n = 45$ for GHRKO; $n = 50$ for WT; $n = 12$ for GHRKO/IGF-1 mice). Two thirds partial PH was performed following a previously described protocol (15), and animals were killed 2 h, 8 h, 24 h, 32 h, 40 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 14 d after PH. All experiments were conducted in accordance with European and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. Livers were harvested either into formalin for histological evaluation and proliferation studies or snap frozen into liquid nitrogen for both mRNA and protein preparations. Bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was injected ip at 50 mg/kg, 2 h before killing the animals except for 2- and 8-h time points. Regarding the STAT5B activation study (see Supplemental Fig. 5), adult male mice were injected ip with human GH (Ipsen; Boulogne sur Seine, France) at 5 mg/kg or with PBS as previously described (16), and were killed 30 min later.

Histological analysis

Paraffin-embedded liver sections of 5 μ m were stained with hematoxylin and eosin for mitotic index quantification or for immunohistochemical studies. Immunohistochemistry was performed with BrdU immunostaining using a biotinylated monoclonal primary antibody (DAKO, Glostrup, Denmark) and was revealed using the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions. For each liver sample, approximately 5000 to 8000 hepatocytes were counted on 15 fields per animal at $\times 200$ magnification.

Real-time quantitative RT-PCR

RNA was purified from livers using the Trizol method (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA synthesis was performed using the Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany). PCR containing the cDNA were set up in duplicate using the QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN, Mainz, Germany). Predesigned QuantiTect Primer Assays (QIAGEN) were used to amplify all analyzed genes using the standard QuantiTect protocol. Quantitative PCR was performed in real time using the LightCycler apparatus (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Relative expression of the target genes was calculated after normalizing to the expression of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, which was used as a housekeeping gene. A WT quiescent control liver served as calibrator sample for the calculation of fold induction in gene expression.

Western blot analysis

Total protein extracts were obtained from snap-frozen tissue by homogenization in lysis buffer as previously described (17).

Immunoprecipitation was performed as previously described (18) from 800 μ g of liver protein extract with antibodies directed either against glutathione-S-transferase or STAT5B. We used three animals per genotype and time point.

Mouse anti-Cyclin D1 was from ZYMED Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA); Cyclin A and Erk1/2 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA); Akt, EGFR, Phospho-EGFR-1068 and phospho-EGFR-1148, STAT3, Phospho-STAT3, Phospho-Akt-ser473, Phospho-p44/42 MAPK and phospho-STAT5-A/B antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); γ -tubulin-GTU-88 antibody was from Sigma (St Louis, MO); and STAT5B and glutathione-S-

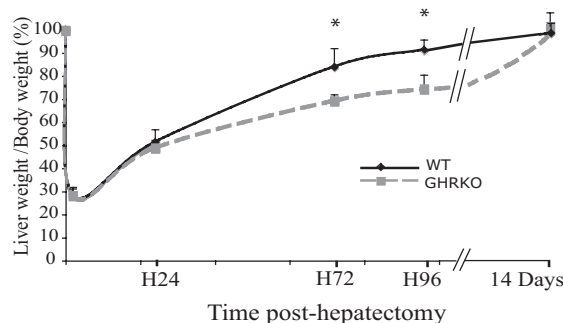


FIG. 1. Kinetics of liver regeneration after PH in WT and GHRKO mice. Change in the ratio of liver weight to body weight during liver regeneration after PH in GHRKO and WT mice at different time-points. Data are expressed as a percentage of the initial value before PH, 100% corresponding to the mean liver weight to body weight ratio of nonoperated animals of each group, namely GHRKO and WT mice. *, $P < 0.05$.

transferase antibodies have been previously described (18). Enhanced chemiluminescence was revealed using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Blots were scanned for densitometry analysis with Image J software using three to four animals per point and genotype.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software package, Statview 4.5 (Abacus Concepts, Piscataway, NJ). Data sets were compared with Student's two-sample t test. All data are representative of four to six animals of each genotype and are expressed as mean \pm SEM. $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

Liver regeneration is impaired in the absence of GHR

We performed two-thirds partial hepatectomies in mutant GHRKO and WT adult males. Regenerating livers were harvested at different time points between 2 h and 14 d after surgery. We observed no postoperative mortality in either of the two groups. In control mice, the average ratio of liver weight to body weight progressively increased from 28% just after PH to 84% and 91% at 72 h and 96 h, respectively (Fig. 1). In contrast, this ratio reached only 69% and 74% in GHRKO mice at the same time points, indicating a defect of liver regeneration in GHRKO mice. This ratio returned to basal levels 14 d after PH in both experimental groups. The proportion of S-phase hepatocytes was investigated by BrdU incorporation (Fig. 2A). In control livers, proliferating cells were first detected 32 h after PH ($4.53\% \pm 3.86$) and peaked at 40 h ($54\% \pm 12.3$) before returning to basal levels after 72 h (Fig. 2A). In contrast, this percentage was drastically reduced in GHRKO mice at 32 h ($0.4\% \pm 0.29$) and 40 h after PH ($9.14\% \pm 3$). Furthermore, in contrast to the control mice, there was no peak of DNA synthesis after

hepatectomy in GHRKO mice. The maximal percentage of BrdU-positive hepatocytes reached was 12.7% at 48 h. This percentage was not statistically different from those at 40 h and 72 h (Fig. 2A). However, proliferating hepatocytes were significantly more numerous at 72 h and 96 h after PH in GHRKO compared with WT mice (Fig. 2A).

We then analyzed the expression of Cyclin A, a typical marker of S phase normally induced 32 h after PH. This was drastically reduced in GHRKO mice (Fig. 2B) at 32 h and 40 h, confirming our results of BrdU incorporation. Furthermore, expression of Cyclin D1 was barely detectable 24 h after PH and was still reduced at 40 h, indicating a deficient or delayed G_1/S transition phase in mutant animals (Fig. 2B).

As expected in the case of a G_1/S transition phase impairment, the mitotic index was also greatly reduced in mutant mice compared with WT as soon as 40 h after PH. This difference further increased at 48 h, when WT mice presented with an average mitotic level 22 times higher than that in GHRKO mice. From 48 to 72 h, the frequency of mitosis decreased in WT regenerating livers whereas, in contrast, it increased in GHRKO livers and was higher than in WT livers 72 h and 96 h after PH (Fig. 2C). To confirm these findings, we examined the expression of FoxM1B, a transcription factor that is essential for hepatocyte entry into mitosis during liver regeneration. Induction of FoxM1B mRNA expression during PH-induced liver regeneration occurs at the G_1/S transition of the cell cycle and increases during G_2/M progression (19). Induction of FoxM1B is essential to restore liver regeneration in old mice after administration of GH (10). In GHRKO mice, induction of FoxM1B mRNA was markedly down-regulated 40 h after PH compared with WT mice. The peak of FoxM1B expression was delayed at 72 h in mutant mice but remained significantly lower than the peak observed in WT mice, corroborating our data on mitosis kinetics (Supplemental Fig. 1 published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>).

To exclude the hypothesis that GHR has an antiapoptotic role during liver regeneration that could account for the diminished proliferation seen in GHRKO mice, hepatocellular apoptosis was measured by routine histological analysis and terminal dUTP nick-end labeling staining. The number of apoptotic cells was very low and comparable between GHRKO and controls at all time points analyzed after PH (data not shown).

To determine whether liver regeneration is also impaired in different conditions associated with parenchymal injury, we studied hepatocyte BrdU incorporation 48 h after an acute ip CCl_4 injection at 3.5 mg/kg and

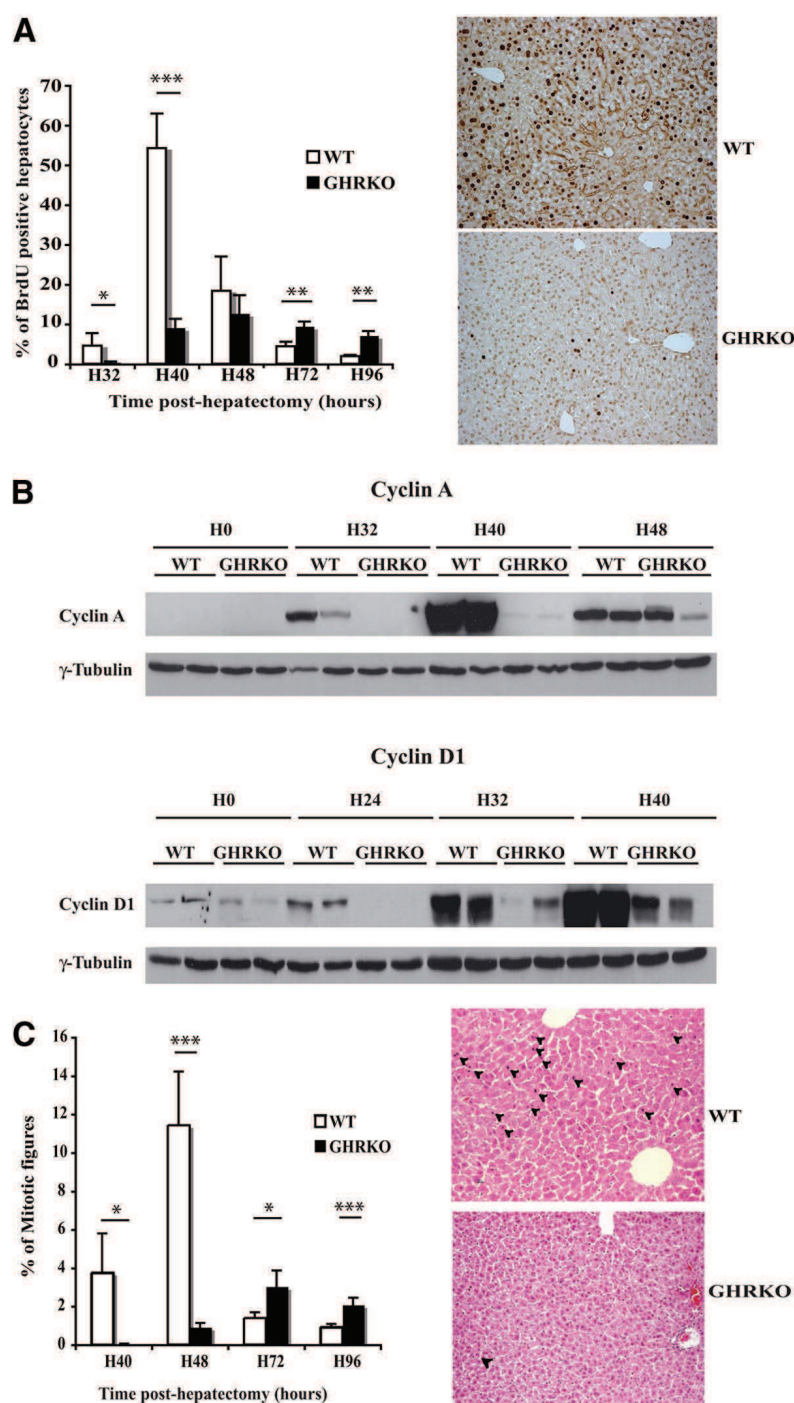


FIG. 2. Kinetics of hepatocyte proliferation after PH in WT and GHRKO livers. **A**, Proportion of BrdU-labeled hepatocytes at different time points after PH. Immunohistochemical detection of BrdU in representative liver sections of WT and GHRKO mice 40 h after PH. Original magnification $\times 200$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **B**, Western blot analysis of Cyclin A and Cyclin D1 at different time points after PH. γ -Tubulin was used as a loading control. Two representative animals of each genotype per point are shown. **C**, Proportion of hepatocytes undergoing mitosis at different time points after PH in GHRKO and WT mice. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Hematoxylin-eosin-stained sections of representative livers of WT and GHRKO mice 48 h after PH. Original magnification $\times 200$. Arrowheads indicate mitotic figures.

observed a significant 2.5-fold reduction in the percentage of positive hepatocytes in GHRKO compared with WT mice (data not shown).

These results indicate that the livers of GHRKO mice have a delayed liver regeneration with a lack of synchronization of hepatocyte DNA synthesis peak after PH. This suggests that GH signaling is required for normal liver regeneration, before hepatocyte DNA replication, either during the priming phase or during the G_1/S transition phase.

GHRKO livers show a normal priming phase during liver regeneration

IL-6 and TNF α are the two main cytokines that are activated during the first 2 h after PH and play a major role in the induction of the priming phase. We found the same profile of liver TNF α mRNA expression at different time points after PH in both genotypes (Supplemental Fig. 2). The expression of IL-6 mRNA 2 h after PH was similar in GHRKO and WT mice (Supplemental Fig. 2). After 8 h, however, IL-6 mRNA expression was higher in GHRKO mice. To further confirm that these cytokines have induced a normal priming phase in mutant mice, we analyzed the activation of some of their downstream proteins. STAT3 and Erk1/2, which are also known as GH pathway target genes in the liver, are phosphorylated upon activation of the IL-6 signaling pathway after PH. We found no difference in STAT3 or Erk1/2 phosphorylation between GHRKO and control livers in the first 2 h after PH (Fig. 3). The PI3K/Akt pathway, which is induced by GH stimulation (20) and is involved in early liver regeneration (1), also showed a similar level of activation in GHRKO and WT mice (Fig. 3). These findings indicate that GHRKO mice have a normal priming phase during liver regeneration.

Analysis of G_1/S transition phase

A metabolic pathway and a growth factor pathway are both involved in the activation of the G_1/S transition phase (1). During the metabolic phase, there is a transient accumulation of triglycerides in the hepatocytes of the remnant lobes between 12 and 24 h after PH (21). We looked at lipid droplet accumulation in mutant and WT liver sections and found no difference in oil red O hepatocyte staining between GHRKO and WT mice at 12 h after PH (data not shown).

Sequential activation of growth factors and the binding to their cognate receptors allows hepatocytes to progress through the G_1/S transition. Two receptors are

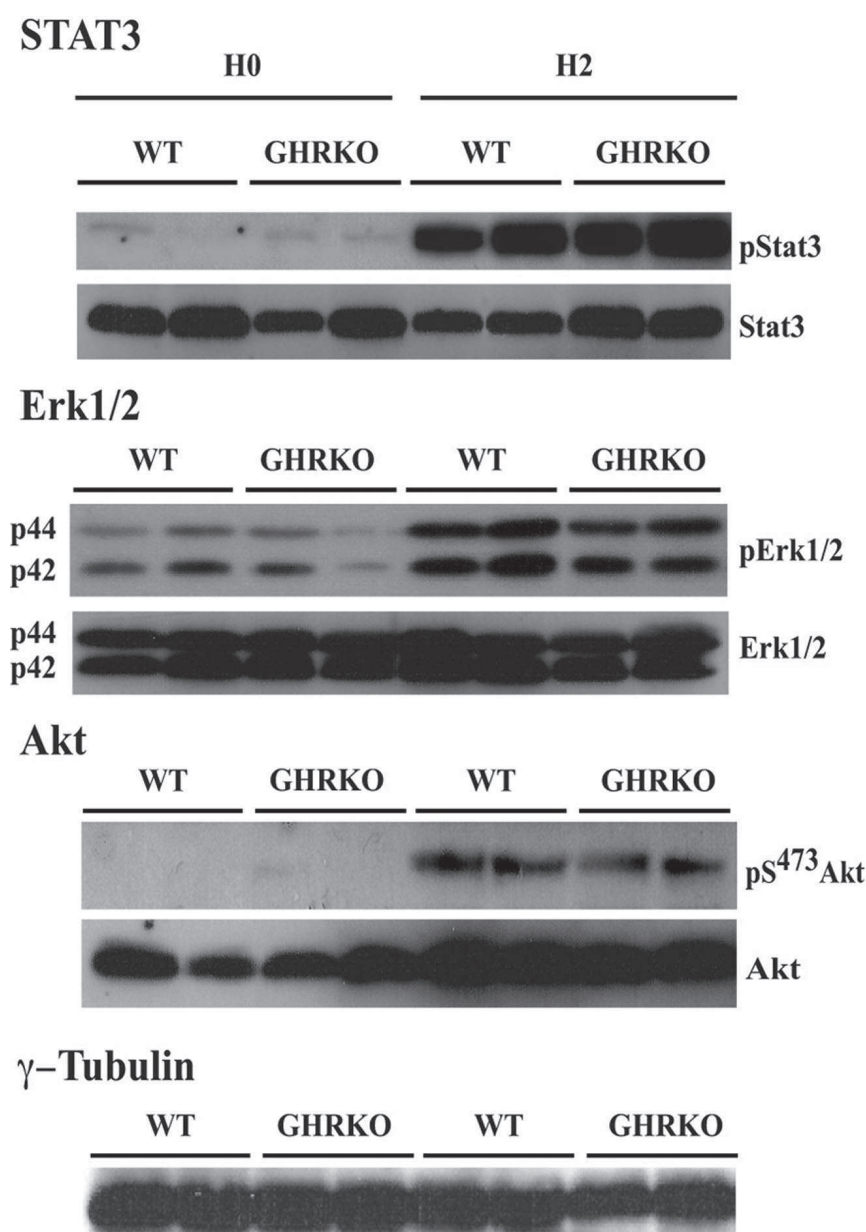


FIG. 3. Activation of signaling proteins during priming phase in WT and GHRKO livers. Western blot analysis of phosphorylated (p) and total STAT3, Erk1/2, and Akt expression in GHRKO mice and controls, before (H0) and 2 h (H2) after PH. Two representative samples of GHRKO mice and controls are shown at the time points indicated.

known to play a major role in this step of liver regeneration: EGFR, with its ligands HB-EGF (heparin-binding EGF), amphiregulin, EGF, and TGF α , and c-Met with its ligand, hepatocyte growth factor (HGF). We analyzed the mRNA levels of these ligands at various time points after PH to determine whether a reduction in their expression could explain the reduced and delayed S-phase entry of the hepatocytes. Transcription of amphiregulin and HB-EGF was induced equally at 8 h in GHRKO and WT mice. However, although their levels rapidly declined in WT mice, they remained highly up-regulated in GHRKO livers 24 h after PH (Fig. 4). EGF mRNA levels were also maintained in GHRKO mice between 8 and 24 h whereas for

WT mice, they declined between these time points. HGF expression was induced during the G₁ phase in both genotypes but was significantly higher in GHRKO compared with WT mice at both 8 h and 24 h after PH (Fig. 4). Finally, TGF α , which is normally induced later during the G₁ phase, was down-regulated in GHRKO mice at 32 h and 40 h after PH. Because liver regeneration occurs normally in TGF α -deficient mice (22), the down-regulation of TGF α expression that we observed in the liver of GHRKO mice could not account for the liver regeneration delay in this model.

These results indicate that the delayed hepatocyte proliferation seen after PH in the absence of GHR cannot be explained by reduced or delayed induction of the growth factors that are activated during the early G₁ phase. In contrast, the sustained activation of the EGFR ligands, amphiregulin, HB-EGF, and EGF 24 h after PH and the up-regulation of HGF in mutant livers after PH could suggest a down-regulation of EGFR and HGF signaling.

Inhibition of EGFR expression during liver regeneration in GHRKO mice

To test this latter hypothesis, we first looked at mRNA expression of EGFR and HGF receptor (c-Met). There was no difference in c-Met mRNA levels between the two groups of animals (Supplemental Fig. 3). In contrast, quiescent livers from GHRKO mice had EGFR transcript levels that were only 10% of those observed in their WT counterparts (Fig. 5A). The corresponding EGFR protein was also barely detectable in GHRKO mice (Fig. 5B). During regeneration, whereas EGFR mRNA expression progressively decreased in WT animals, it modestly increased in GHRKO mice and reached the WT liver expression level 24 h after PH (Fig. 5A). However, although EGFR protein is expressed at the same level in quiescent liver and in regenerating liver until 32 h after PH in WT animals, it remained barely detectable in GHRKO mice. Even 32 h after PH, EGFR expression level was still lower than in WT (Fig. 5B). These results imply that EGFR expression is controlled by the GHR pathway at the transcriptional level and also potentially at the posttranscriptional level.

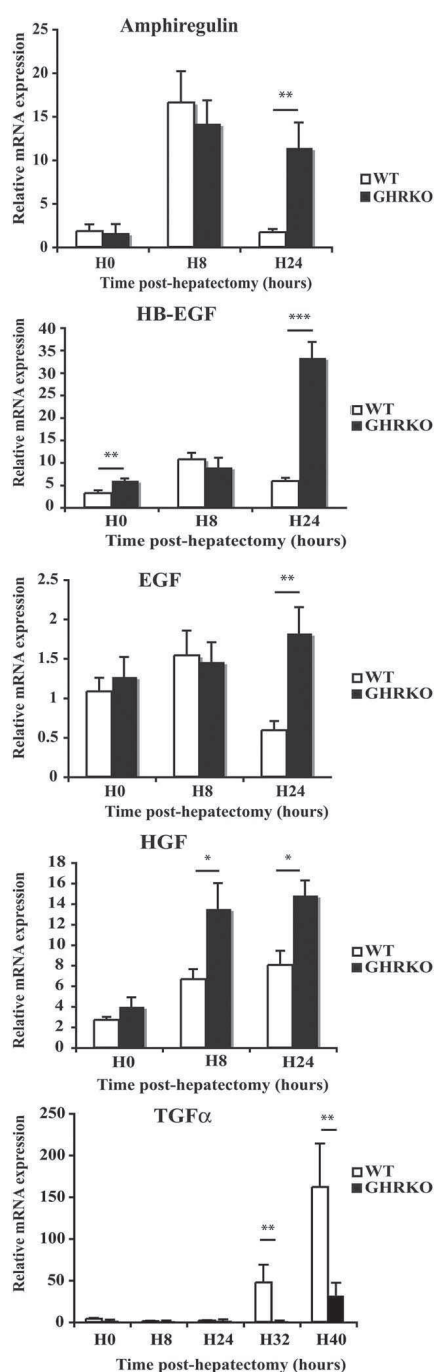


FIG. 4. Expression of growth factors during liver regeneration. Expression of various growth factors, measured by real-time RT-PCR, before and at indicated time points after PH in GHRKO and WT livers. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

tional level. We then examined EGFR activation (Fig. 5B) and observed an absence of EGFR phosphorylation in GHRKO mice even 32 h after PH, when EGFR expression was restored. This suggests a posttranslational control of EGFR by GH signaling. To exclude compensatory mechanisms by other EGFR family members, the expression of ErbB2 and ErbB3 was investigated by quantitative RT-PCR. There was no significant difference between the two groups of animals at any of the time points tested (Fig. 5C).

Finally, to further support the role of EGFR in hepatocyte proliferative response, we quantified BrdU incorporation of in primary culture of WT and GHRKO hepatocytes in response to insulin and EGF. Although GHRKO hepatocytes remained sensitive to insulin for proliferation, they did not respond to EGF addition in contrast to WT hepatocytes (data not shown). These findings suggest that EGFR down-regulated expression and the complete absence of its activation are the major defects in GHRKO livers that could account for their impaired regeneration.

Liver regeneration defect is Erk1/2 dependent in the absence of GHR

There are four main pathways downstream of GHR that are known to be involved in cell proliferation: STAT5B/IGF-1, Erk1/2, PI3K/Akt, and STAT3 (20). The latter three are also activated by induction of EGFR and c-Met receptors. STAT5B is expressed at the same protein levels during liver regeneration in WT and GHRKO mice (data not shown). We looked at STAT5B activation by immunoprecipitation at different time points during regeneration and found no increase in WT livers (Supplemental Fig. 5A). To reinforce these data, we also looked at STAT5B known transcriptional targets during the regeneration process, two positively regulated targets, IGF-1 and suppressor of cytokine signaling (Socs)2, and one negatively regulated target, IGF-binding protein (IGFBP)-1. As expected, STAT5B pathway being down-regulated in GHRKO mice, we showed a lower IGF-1 and Socs2 expression and a higher IGFBP-1 expression in their quiescent livers compared with WT ones. Liver regeneration did not modify STAT5B positively regulated targets in GHRKO and WT mice. In contrast IGFBP-1 was up-regulated both in GHRKO and WT mice after PH. This increase probably resulted from the activation of IGFBP-1 expression regulators other than STAT5B in both types of mice as has been already described (23–25). These results suggest that PH does not induce a specific activation of STAT5B and that this pathway remains blunted in GHRKO mice during the regenerative process.

IGF-1 synthesis is mainly induced through GH stimulation as evidenced by its absence in the liver of GHRKO mice. We wondered whether reexpressing IGF-1 could reverse the liver regeneration defect observed in GHRKO mice. To test this hypothesis, we crossed GHRKO mice with transgenic mice expressing IGF-1 specifically in the liver (GHRKO/TgIGF-1). TgIGF-1 transgenic mice express an active form of IGF-1 in the liver that is secreted in the serum and induces an increased body length and weight in the absence of GHR signaling (14). GHRKO/TgIGF-1 mice showed partial reversal of GHRKO growth retardation (Table 1) but not of peak hepatocyte DNA

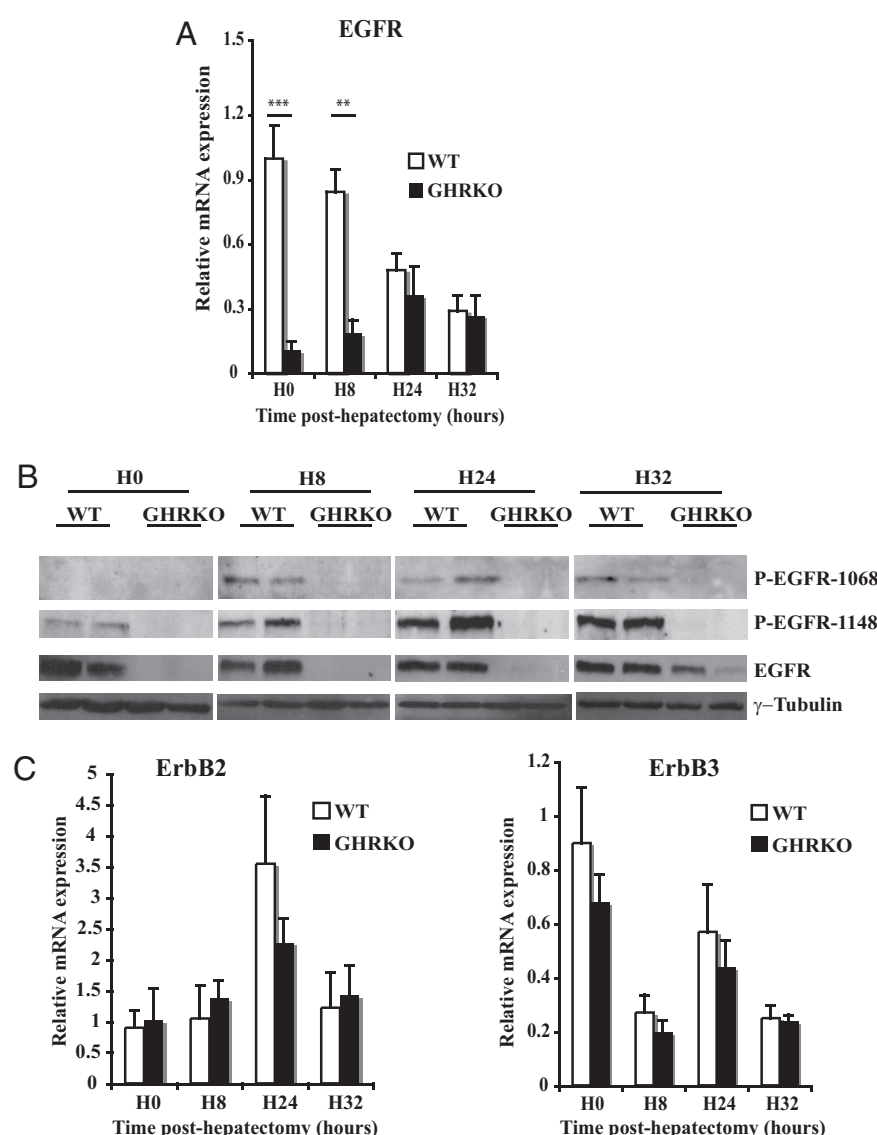


FIG. 5. Expression of ErbB receptor family members in regenerating GHRKO and WT livers at different time points after surgery. A and C, Expression of EGFR, ErbB2, and ErbB3, measured by real time RT-PCR, before and at different time points after PH in GHRKO and WT livers. B, Western blot analysis of total EGFR and phospho-EGFR in GHRKO mice and controls at indicated time points after PH. The representative samples from two distinct regenerative mouse livers of GHRKO mice and controls are shown at the indicated time points. The γ -tubulin protein band was used to normalize expression levels. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

synthesis 40 h after PH with a percentage of BrdU incorporation not different from the one observed for GHRKO mice between 32 h and 48 h (Table 1). Furthermore, no mitosis was observed in GHRKO/TgIGF-1 mice at this time point, as in GHRKO mice (data not shown). These results strongly suggest that the liver regeneration defect observed in the absence of GH signaling is IGF-1 independent. To confirm these results, we showed that IGF-1 reinduction into the liver of GHRKO mice has an effect neither on expression/phosphorylation of EGFR (Fig. 6A) nor on mRNA expression of IGFBP-1 and Socs2 (Supplemental Fig. 5).

We then analyzed Erk1/2, PI3K/Akt, and STAT3 during the G_1/S progression phase, which occurs between 8

and 40 h after PH. There was no difference in Akt phosphorylation between the two groups of animals at any of the studied time points. The analysis of STAT3 activation showed an unexpected sustained phosphorylation in GHRKO mice at 8 and 24 h, whereas it was only reinduced at 32 h in WT mice (Fig. 6B). Expression of SOCS3, which is known to negatively regulate STAT3 activation in a feedback loop (1), was lower in GHRKO mice compared with controls at 8 h after PH (Supplemental Fig. 4). Finally, phosphorylation of Erk1/2 was drastically reduced in GHRKO mice compared with WT mice between 8 and 32 h after PH (Fig. 6B). These results indicate that, among the main downstream pathways involved in liver regeneration that are activated by EGFR signaling, only Erk1/2 is down-regulated in GHRKO mice.

Discussion

The inactivation of individual genes involved in liver regeneration most often leads to a delayed entry of hepatocytes into the S phase, but not to an absence of a DNA synthesis peak. This is due to the high functional redundancy between the genes required for this process. In the present study, we showed that GHR deficiency leads to an absence of synchronization of entry into the S phase for hepatocytes.

We then aimed to identify which pathways, controlled by GH signaling, were involved in this phenotype. We first demonstrated that the priming phase and lipid droplet accumulation in hepatocytes, two essential steps for liver regeneration, occur normally in the absence of GHR.

We then analyzed the two receptor pathways that were required for progression of hepatocytes from G_1 to S phase during liver regeneration. We found a major defect in EGFR expression and activation in quiescent livers as well as during the initial phases of regeneration. Therefore, the up-regulation of the EGFR ligands, amphiregulin, HB-EGF, and EGF, at this stage of the process could be due to an impaired negative feedback loop in the absence of EGFR signaling. Because HGF was also up-regulated, we cannot exclude a

TABLE 1. Analysis of liver weight to body weight ratio and of hepatocyte proliferation rate after PH in WT, GHRKO, and GHRKO/TgIGF-1 mice

	WT mice	GHRKO mice	GHRKO/IGF1 mice
Liver weight/body weight (%)	4.53 ± 0.25 <i>P</i> < 0.0001 <i>n</i> = 10	3.77 ± 0.24 <i>n</i> = 10	ND
Body weight at 10 wk (g)	23 ± 0.62 <i>P</i> < 0.0001 <i>n</i> = 10	11.22 ± 0.59 <i>P</i> = 0.0005 <i>n</i> = 10	15.42 ± 1.58 <i>P</i> < 0.0001 <i>n</i> = 12
% BrdU + hepatocytes at H32 after PH	4.53 ± 3.86 <i>P</i> = 0.05 <i>n</i> = 6	0.4 ± 0.29 0.224 <i>n</i> = 6	0.83 ± 0.05 0.212 <i>n</i> = 4
% BrdU + hepatocytes at H40 after PH	56.26 ± 10.54 <i>P</i> = 0.0004 <i>n</i> = 5	9.14 ± 3.02 0.666 <i>n</i> = 5	7.6 ± 5.33 <i>P</i> = 0.0082 <i>n</i> = 4
% BrdU + hepatocytes at H48 after PH	18.37 ± 11.7 0.228 <i>n</i> = 6	11.5 ± 7.13 0.140 <i>n</i> = 6	6.27 ± 1.2 <i>P</i> = 0.033 <i>n</i> = 4

Effects of liver-specific IGF-1 expression in GHRKO mice (GHRKO/TgIGF-1) on body weight and proportion of BrdU-labeled hepatocytes, 40 h after PH. Data are reported for GHRKO mice, GHRKO/TgIGF-1 mice, and WT mice as means ± SEM, and *n* refers to the number of animals studied. There is no significant difference in the percentage of BrdU-positive hepatocytes between GHRKO/TgIGF-1 and GHRKO livers at any time point analyzed. *P* in WT column compares WT with GHRKO, *P* in GHRKO column compares GHRKO with GHRKO/IGF1, and *P* in GHRKO/IGF1 compares GHRKO/IGF1 with WT.

compensatory mechanism by the c-Met pathway. However, if this was the case, it was not sufficient to restore the DNA synthesis peak.

The essential role of EGFR in liver regeneration has recently been emphasized by studies of liver EGFR-deficient mice (26) or injection of small interfering RNA directed against EGFR (27). In both cases, a major liver regeneration defect with no BrdU incorporation peak, similar to GHRKO mice, has been observed, corroborating our results.

Our data strongly suggest that EGFR down-regulation is responsible for the absence of synchronization and delayed hepatocyte S-phase entry in GHRKO livers, a hypothesis that could be confirmed by the rescue of EGFR activation using genetic or pharmacological approaches.

Previous studies have already shown cross talks between GH and EGF signaling pathways (28, 29). Control of EGFR expression by the GHR pathway has been suggested both at the transcriptional (30) and translational levels (31). In the present study, we show that GHR signaling controls both transcriptional and protein activation of EGFR during liver regeneration. It is tempting to postulate that the transcriptional regulation is through STAT5B, which mediates the main GHR pathway effects in the liver. We confirmed here that STAT5B could not be activated upon GH stimulation in GHRKO mice. However, we did not detect any induction of STAT5B activation in the liver of WT mice during regeneration. Therefore, we hypothesize that STAT5B controls EGFR mRNA expression in the quiescent liver and that this basal expression is required for hepatocyte G₁/S phase progression. This hypothesis was recently strengthened by the observa-

tion of an impaired EGFR expression in STAT5B-deficient livers (32). Our results also suggest a role of GHR pathway in subsequent EGFR tyrosine phosphorylation during liver regeneration by currently unknown mechanisms.

Cross talks have also been described between EGFR and IGF1 pathways, with IGF-1 stimulation transactivating EGFR (33, 34). Furthermore, IGF-1 is a major downstream target of the GHR pathway. We demonstrated that GHRKO animals reexpressing IGF-1 specifically in the liver induce neither expression nor activation of EGFR. According to this result, the livers of these GHRKO/TgIGF-1 animals were unable to correct their regeneration impairment. Therefore, although invalidation of IGF-1 induces a liver regeneration delay (11), its expression in the liver is not sufficient to rescue the liver phenotype induced by GHR deficiency.

In the liver, activation of GHR induces three main pathways known to be involved in cell proliferation: PI3K/Akt, Erk1/2, and STAT3 (1). We followed the kinetics of their activation during liver regeneration in the absence of GHR. No significant difference in Akt phosphorylation was found between GHRKO and WT mice. Unexpectedly, we found an up-regulation of STAT3 phosphorylation in mutant mice. The consequences of an increased phosphorylated STAT3 on liver regeneration are ambiguous in the literature. Some authors reported that a sustained STAT3 phosphorylation is associated with an increased hepatocyte proliferation rate in the absence of the SOCS3 inhibitor (35). In contrast, constitutive expression of IL-6 in the liver of transgenic mice, together with an increased STAT3 phosphorylation, leads to a defect in hepatocyte proliferation (36). This controversy can be reconciled when one

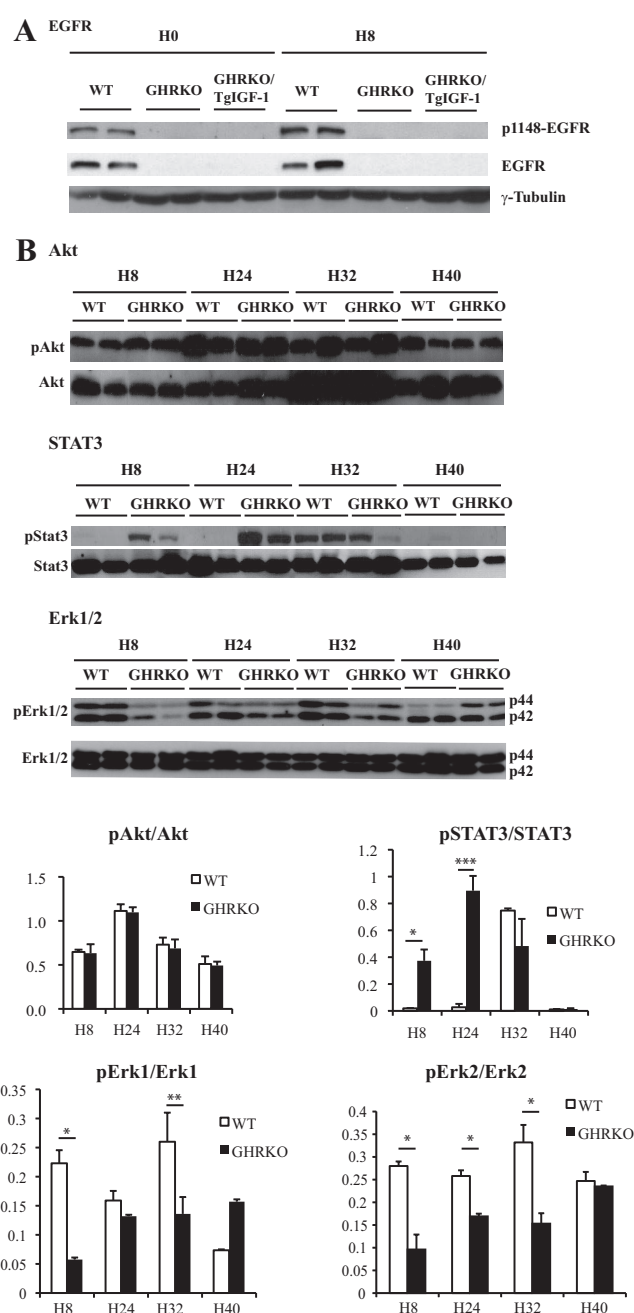


FIG. 6. Analysis of EGFR activation and GHR downstream pathways during liver regeneration in GHRKO, WT, and GHRKO/TgIGF-1 mouse livers. **A**, Potential EGFR transactivation by IGF-1 was studied. Western blot analysis of phospho-EGFR and total EGFR expression in liver of GHRKO/TgIGF-1 mice, GHRKO mice, and controls at indicated time points before and after PH. The γ -tubulin protein band was used to normalize expression levels. **B**, The main role of Erk1/2 in GHR signaling during liver regeneration was underlined by the Western blot analysis of phosphorylated (p) and total forms of hepatic expression of Akt, Erk1/2, and STAT3 in GHRKO mice and controls at indicated time points after PH. Representative samples from two distinct regenerative mouse livers of GHRKO mice and controls are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

considers that an increased SOCS3 expression rather than a sustained STAT3 activation is responsible for an impaired liver regeneration. We therefore examined *Socs3* mRNA expression and found it to be lower in GHRKO

mice than in WT mice at its peak level of synthesis during liver regeneration. This result can explain the up-regulation of STAT3 and is consistent with previously published data showing that, in the liver, *Socs3* mRNA expression is under the control of STAT5B (37). Our data therefore suggest that even if sustained STAT3 phosphorylation does not impair liver regeneration, its effects are not sufficient to bypass the negative effect of GHR deficiency on hepatocyte proliferation. Finally, we looked at Erk1/2 activation and found it to be clearly down-regulated in GHRKO mice during the G_1/S phase of liver regeneration. The MAPK kinase/ERK activation cascade has been clearly implicated in hepatocyte DNA replication both *in vitro* and *in vivo* via cyclin D1 induction (38). Moreover, Erk1/2 is activated in the liver by various EGFR ligands during the G_1/S transition phase (39–41). We observed that down-regulation of Erk1/2 occurred only when activated EGFR pathway was required to allow hepatocytes to progress toward S phase and not before, during the priming phase. These results suggest that Erk1/2 is a downstream mediator of EGFR signaling during liver regeneration.

In conclusion, we identified that both expression and activation of EGFR were under the tight control of the GHR pathway during liver regeneration. Because EGFR pathway is known to be responsible for the synchronous S-phase entry of hepatocytes during liver regeneration, we also propose EGFR as the essential mediator in the GHR pathway for liver regeneration. We therefore excluded the involvement of the other GHR pathways activated in the liver, namely IGF-1, Akt, and STAT3, in this physiological phenomenon.

Progression from fibrosis to cirrhosis is characterized by an impairment of GH signaling and by a hepatocyte-proliferative arrest (4–8). It is of interest, therefore, to verify whether there is a correlation between this proliferative inhibition and a down-regulation of the EGFR signaling at this end stage of the disease.

Acknowledgments

We thank Frédérique Verdier (Institut Cochin, Inserm, U1016, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France), Michel Polak (Faculté de Médecine, Inserm U845, Université Paris Descartes, Paris, France), and Ipsen Pharma (Boulogne-Billancourt, France) for providing GH samples and Vincent Goffin (Faculté de Médecine, Inserm, U845, Research Center Growth and Signaling, Université Paris Descartes, Paris, France), Chantal Desdouets, and Séverine Morizur (Institut Cochin, Inserm, U1016, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France) for the critical reading of the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jacques-Emmanuel Guidotti, Institut Cochin, Inserm U.1016,

Département Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. E-mail: jacques-emmanuel.guidotti@inserm.fr.

A. Zerrad-Saadi is the recipient of a fellowship from the Domaine d'Intérêt Majeur stem Pole, Region île de France.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ 2006 Liver regeneration. *Hepatology* 43:S45–S53
2. Barclay JL, Kerr LM, Arthur L, Rowland JE, Nelson CN, Ishikawa M, d'Aniello EM, White M, Noakes PG, Waters MJ 2010 *In vivo* targeting of the growth hormone receptor (GHR) Box1 sequence demonstrates that the GHR does not signal exclusively through JAK2. *Mol Endocrinol* 24:204–217
3. Ekberg S, Luther M, Nakamura T, Jansson JO 1992 Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *J Endocrinol* 135:59–67
4. Assy N, Pruzansky Y, Gaitini D, Shen Orr Z, Hochberg Z, Baruch Y 2008 Growth hormone-stimulated IGF-1 generation in cirrhosis reflects hepatocellular dysfunction. *J Hepatol* 49:34–42
5. Donaghy AJ, Delhanty PJ, Ho KK, Williams R, Baxter RC 2002 Regulation of the growth hormone receptor/binding protein, insulin-like growth factor ternary complex system in human cirrhosis. *J Hepatol* 36:751–758
6. Delhay M, Louis H, Degraef C, Le Moine O, Devière J, Peny MO, Adler M, Galand P 1999 Hepatocyte proliferative activity in human liver cirrhosis. *J Hepatol* 30:461–471
7. Marshall A, Rushbrook S, Davies SE, Morris LS, Scott IS, Vowler SL, Coleman N, Alexander G 2005 Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 128:33–42
8. Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA 2000 Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 287:1253–1258
9. Cummings DE, Merriam GR 1999 Age-related changes in growth hormone secretion: should the somatopause be treated? *Semin Reprod Endocrinol* 17:311–325
10. Krupczak-Hollis K, Wang X, Dennewitz MB, Costa RH 2003 Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through forkhead box m1b. *Hepatology* 38:1552–1562
11. Pennisi PA, Kopchick JJ, Thorgeirsson S, LeRoith D, Yakar S 2004 Role of growth hormone (GH) in liver regeneration. *Endocrinology* 145:4748–4755
12. Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A 2005 Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor 1/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* 146:851–860
13. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ 1997 A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13215–13220
14. Liao L, Dearth RK, Zhou S, Britton OL, Lee AV, Xu J 2006 Liver-specific overexpression of the insulin-like growth factor-I enhances somatic growth and partially prevents the effects of growth hormone deficiency. *Endocrinology* 147:3877–3888
15. Mitchell C, Willenbring H 2008 A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc* 3:1167–1170
16. Choi HK, Waxman DJ 2000 Plasma growth hormone pulse activation of hepatic JAK-STAT5 signaling: developmental regulation and role in male-specific liver gene expression. *Endocrinology* 141:3245–3255
17. Guidotti JE, Brégerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C 2003 Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 278:19095–19101
18. Verdier F, Chrétien S, Muller O, Varlet P, Yoshimura A, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P 1998 Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 273:28185–28190
19. Ye H, Holterman AX, Yoo KW, Franks RR, Costa RH 1999 Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase. *Mol Cell Biol* 19:8570–8580
20. Herrington J, Carter-Su C 2001 Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12:252–257
21. Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA 2004 Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* 40:1322–1332
22. Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetke NC, Lee DC 1996 Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor- α -targeted mice. *Mol Carcinog* 15:183–189
23. Mounier C, Dumas V, Posner BI 2006 Regulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin: central role for mammalian target of rapamycin independent of forkhead box O proteins. *Endocrinology* 147:2383–2391
24. Samstein B, Hoimes ML, Fan J, Frost RA, Gelato MC, Lang CH 1996 IL-6 stimulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 production. *Biochem Biophys Res Commun* 228:611–615
25. Degenhardt T, Matilainen M, Herzig KH, Dunlop TW, Carlberg C 2006 The insulin-like growth factor-binding protein 1 gene is a primary target of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 281:39607–39619
26. Natarajan A, Wagner B, Sibilia M 2007 The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17081–17086
27. Paranjpe S, Bowen WC, Tseng GC, Luo JH, Orr A, Michalopoulos GK 2010 RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats. *Am J Pathol* 176:2669–2681
28. Huang Y, Kim SO, Jiang J, Frank SJ 2003 Growth hormone-induced phosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor in 3T3-F442A cells. Modulation of EGF-induced trafficking and signaling. *J Biol Chem* 278:18902–18913
29. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, Honjo M, Takahashi M, Takahashi T, Hirai H, Tsushima T, Akanuma Y, Fujita T, Komuro I, Yazaki Y, Kadowaki T 1998 Growth hormone-induced tyrosine phosphorylation of EGF receptor as an essential element leading to MAP kinase activation and gene expression. *Endocr J* 45(Suppl):S27–S31
30. Lichanska AM, Waters MJ 2008 How growth hormone controls growth, obesity and sexual dimorphism. *Trends Genet* 24:41–47
31. González L, Diaz ME, Miquet JG, Sotelo AI, Fernández D, Domínguez FP, Bartke A, Turyn D 2010 GH modulates hepatic epidermal growth factor signaling in the mouse. *J Endocrinol* 204:299–309
32. Blas L, Kornfeld JW, Schramek D, Musteanu M, Zollner G, Gumbold J, van Zijl F, Schneller D, Esterbauer H, Egger G, Mair M, Kenner L, Mikulits W, Eferl R, Moriggl R, Penninger J, Trauner M, Casanova E 2010 Disruption of the growth hormone-signal transducer and activator of transcription 5-insulin like growth factor 1 axis severely aggravates liver fibrosis in a mouse model of cholestasis. *Hepatology* 51:1319–1326
33. Roudabush FL, Pierce KL, Maudsley S, Khan KD, Luttrell LM 2000 Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells. *J Biol Chem* 275:22583–22589
34. Zhou Q, Meng D, Yan B, Jiang BH, Fang J 2006 Transactivation of

- epidermal growth factor receptor by insulin-like growth factor 1 requires basal hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 580:5161–5166
35. Riehle KJ, Campbell JS, McMahan RS, Johnson MM, Beyer RP, Bammler TK, Fausto N 2008 Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J Exp Med* 205:91–103
36. Lieskovska J, Guo D, Derman E 2003 Growth impairment in IL-6-overexpressing transgenic mice is associated with induction of SOCS3 mRNA. *Growth Horm IGF Res* 13:26–35
37. Cui Y, Hosui A, Sun R, Shen K, Gavrilova O, Chen W, Cam MC, Gao B, Robinson GW, Hennighausen L 2007 Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration. *Hepatology* 46:504–513
38. Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G 1999 The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol* 19:6003–6011
39. Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, Avila MA 2005 Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 128:424–432
40. Kiso S, Kawata S, Tamura S, Inui Y, Yoshida Y, Sawai Y, Umeki S, Ito, N, Yamada A, Miyagawa J, Higashiyama S, Iwawaki T, Saito M, Taniguchi N, Matusuzawa Y, Kohno K 2003 Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 124:701–707
41. Rescan C, Coutant A, Talarmin H, Theret N, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Baffet G 2001 Mechanism in the sequential control of cell morphology and S phase entry by epidermal growth factor involves distinct MEK/ERK activations. *Mol Biol Cell* 12:725–738



Sign up for eTOC alerts today
to get the latest articles as soon as they are online.

<http://jcem.endojournals.org/subscriptions/etoc.shtml>

6.3.2 Résultats et discussion

Au cours de ce travail, nous avons ainsi mis en évidence un défaut de l'entrée en phase S des hépatocytes chez les souris GHRKO. Après analyse des étapes précoces contrôlant la prolifération, nous avons pu montrer une inhibition de l'expression d'EGFR chez les souris dépourvues en récepteur de la GH. A l'état quiescent, l'analyse du transcrit a révélé une expression de l'EGFR de seulement 10% de celle des contrôles ainsi qu'une quasi absence de la protéine. Au cours de la régénération hépatique, le transcrit et la protéine sont réinduits progressivement, respectivement à partir de 24 et 32h, tout en restant à un niveau bien inférieur à celui des contrôles. Par ailleurs, même si la protéine est exprimée à 32h, cette dernière n'est pas activée (phosphorylée) à ce timing. Parallèlement à cette inhibition, nous avons noté une augmentation de l'expression des ligands de l'EGFR (Amphiréguline, HB-EGF, EGF) au cours de l'hépatectomie partielle chez les animaux GHRKO. Ces résultats confortent la dérégulation du signal de la voie. En analysant les voies de signalisation en aval de l'axe GH/EGFR (STAT5b, Erk1/2, PI3K et STAT3), nous avons observé une diminution drastique de la phosphorylation de Erk1/2 au cours de la régénération hépatique, suggérant que l'inhibition de la régénération hépatique passe par cette voie. D'autre part, l'induction de l'expression hépatique d'IGF-1 par le truchement du croisement des animaux GHRKO avec des animaux transgéniques pour IGF1 n'a pas permis de restaurer la prolifération des hépatocytes post hépatectomie. Ceci indique de façon certaine que si IGF-1 est impliqué dans le défaut de régénération chez les animaux GHRKO, il n'est pas l'acteur principal de la voie de l'hormone de croissance dans ce processus.

A travers cette étude, nous avons montré que l'hormone de croissance contrôle à la fois l'expression et l'activation de l'EGFR au cours de la régénération hépatique. Etant donnée l'importance de la voie de signalisation EGFR pour l'entrée synchrone des hépatocytes en phase S post hépatectomie, nous postulons que le contrôle de l'hormone de croissance sur la régénération du foie est médié par l'EGFR.

D'autre part, de précédents travaux ont montré que l'inhibition de STAT5 entraîne un défaut de régénération après hépatectomie partielle [84]. Dans cette étude, les auteurs expliquent le défaut de régénération chez leurs animaux dépourvus de STAT5 par l'activation aberrante de STAT1 dans le foie. En effet, ils utilisent des souris mutées à la fois pour les gènes STAT5 et STAT1 spécifiquement dans le foie et montrent ainsi une prolifération cellulaire qui n'est pas significativement différente par rapport aux contrôles. En

réalité, les auteurs étudient la restauration de la prolifération à un seul temps, ce qui ne permet pas de conclure sur l'effet de la délétion sur la cinétique de régénération hépatique. De plus, la prolifération des souris doublement délétées ne semble pas non plus significativement différente du modèle STAT5^{-/-} et les souris présentent plutôt un phénotype intermédiaire entre les souris contrôles et les souris STAT5^{-/-}. On peut également noter que, contrairement au modèle GHRKO, l'inhibition de l'expression de STAT5 entraîne l'activation de voies compensatrices telles que STAT3 ou encore STAT1, par l'hormone de croissance et d'autres ligands potentiels ne permettant pas d'étudier réellement le rôle de STAT5 dans la régénération hépatique. En revanche, une autre étude avait montré une inhibition de l'expression de l'EGFR chez des souris dépourvues de STAT5 hépatique [320], ce qui pourrait également expliquer l'inhibition de la régénération du foie chez ces souris. De façon similaire, nous observons une absence d'activation de STAT5b dans le foie chez notre modèle de souris. Ainsi, nous proposons que le contrôle de la voie de l'hormone de croissance sur l'EGFR pourrait s'effectuer via STAT5b (Figure 6.4).



FIGURE 6.4 – Modèle proposé du contrôle moléculaire de l'entrée synchronisée en phase S des hépatocytes post hépatectomie

Chapitre 7

Le défaut de régénération du foie en cas de stéatose hépatique

A la suite de ce premier travail, nous avons poursuivi nos recherches sur la régénération hépatique en nous concentrant sur une situation pathologique corrélée à un déficit de la voie de l'hormone de croissance : la stéatose hépatique. Comme nous l'avons vu en introduction, la stéatose hépatique est aussi associée à un défaut de régénération hépatique aussi bien dans les modèles animaux et chez l'homme. Ainsi, pour cette étude qui a constitué la majeure partie de mon travail de doctorat, nous nous sommes intéressés en particulier à comprendre le défaut de régénération associé à la stéatose hépatique.

7.1 Obésité, stéatose hépatique et hormone de croissance

La diminution de la voie de l'hormone de croissance a souvent été associée à la stéatose et à l'obésité, sans que l'on comprenne laquelle de ces anomalies découlait de l'autre. En effet, on a notamment observé que des patients présentant des déficiences en hormone de croissance ou une mutation au niveau du récepteur de l'hormone de croissance [321] développaient un surpoids associé à une stéatose hépatique. La déficience de l'hormone de croissance chez l'adulte (AGHD) par exemple a pour conséquence d'augmenter l'obésité viscérale, provoque également une hyperlipidémie [322] ainsi qu'une plus grande susceptibilité à développer une stéatose hépatique [323]. On retrouve les mêmes observations chez les patients présentant un dysfonctionnement de l'hypothalamus (panhypopituitarisme), avec une prise de poids, une dyslipidémie et un risque accru de déclarer une stéatose ainsi qu'une cirrhose [324]. De façon cohérente, ce phénotype se retrouve sur des modèles murins

déficient en récepteur de l'hormone de croissance [291], Jak2 [292] ou muté pour STAT5 [84] dans le foie.

Inversement, bon nombre d'études montrent une diminution de la voie de l'hormone de croissance avec l'obésité. On observe ainsi une diminution des sécrétions d'hormone de croissance [325] ainsi qu'une augmentation de l'élimination de celle-ci chez des patients en surpoids [326]. Plus récemment, une équipe a montré les mêmes effets sur l'hormone de croissance avec un comportement hyperphagique sur le court terme sans que les patients ne présentent d'obésité à la base [327]. Par ailleurs, une étude transversale portant sur 1667 patients présentant une stéatose hépatique a montré un taux de GH inférieur aux contrôles [328]. Les mêmes résultats ont été retrouvés sur une cohorte de patients obèses présentant une fibrose [329]. D'autres travaux ont également montré une diminution d'IGF1 [330] ou de l'axe tout entier GH/IGF1 sur des patients présentant une stéatose du foie [331]. Parallèlement à ces données, de nombreuses études ont montré que l'injection d'hormone de croissance permettait à des patients présentant une déficience de la voie ou obèses, d'améliorer leur phénotype stéatosique et de surpoids [332].

L'ensemble de la littérature souligne de façon incontestable le lien existant entre la signalisation de l'hormone de croissance, l'obésité et la stéatose. Il apparaît clair qu'une absence d'hormone de croissance induit des désordres métaboliques, mais que ceux-ci ont aussi un effet inhibiteur sur les sécrétions d'hormone de croissance. Pourtant, même si il a été démontré que l'augmentation sérique d'acides gras et de glucose sanguin a un effet inhibiteur sur les sécrétions d'hormone de croissance et inversement, on ne connaît toujours pas le mécanisme en jeu dans ces différentes observations.

7.2 Publication n°2 : La dérégulation de l'axe GH/EGFR participe au défaut de régénération du foie en cas de stéatose

7.3 Synthèse

Le défaut de régénération hépatique associé à la stéatose sur modèles murins est connu depuis plusieurs années. On sait également que cette condition représente un facteur de risque concernant les transplantations hépatiques ou les résections majeures du foie sur l'Homme. Bien que cela n'ait pas été clairement démontré, on associe généralement cette morbidité accrue à un défaut de régénération hépatique post opération. Pour cette raison, identifier les

voies moléculaires responsables de ce défaut de régénération dans le cadre de la stéatose hépatique est donc d'un intérêt clinique évident.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à résoudre cette question en adoptant une approche différente de celles déjà publiées. En effet, aucun mécanisme général n'a à ce jour été mis en évidence pour expliquer ce défaut de régénération du foie stéatosique et ce, d'autant que certains résultats contradictoires ont été rapportés comme nous l'avons vu dans l'introduction. Un des objectifs de ce projet a donc été de trouver une altération d'une voie connue pour être essentielle à la régénération hépatique et commune à l'ensemble des modèles de stéatose hépatique, permettant ainsi de réconcilier les discordances rapportées dans la bibliographie. En effet, la littérature sur le sujet met majoritairement en exergue des dérégulations au niveau des voies inflammatoires, variables selon les modèles étudiés. Par cette étude, nous avons donc cherché à décrypter les bases moléculaires responsables du défaut de régénération hépatique du foie stéatosique sur différents modèles murins. Pour ce faire, nous avons orienté notre recherche autour de la dérégulation de l'axe GH/EGFR, avec comme hypothèse de départ qu'un défaut d'expression de l'EGFR serait impliqué dans le défaut de régénération du foie stéatosique.

Nous avons étudié l'expression de l'EGFR sur des patients présentant une stéatose hépatique, ainsi que sur deux modèles murins de stéatose hépatique. Le modèle génétique *ob/ob*, ainsi qu'un modèle induit par un régime déficient en Méthionine et Choline (MCD). Nous avons fait ce choix pour disposer de deux modèles différents de stéatose, à des stades d'avancement de la maladie différents et discriminées sur l'obésité. En effet, la souris *ob/ob* présente une obésité et peu d'inflammation, tandis que le modèle MCD présente a contrario un amaigrissement et une forte inflammation hépatique.

Pour parer à une trop grande mortalité animale tout en conservant un pic de synthèse de BrdU, indiquant une mise en cycle synchrone des hépatocytes, nous avons pratiqué sur les modèles *ob/ob* et MCD de stéatose hépatique des hépatectomies de 55% au lieu de l'hépatectomie des 2/3 plus classiquement utilisée pour l'étude de la régénération hépatique. Nous avons confirmé que le défaut de régénération hépatique observé dans ces deux modèles était lié à un blocage de la transition G1/S. Nous avons ensuite analysé différentes voies de signalisation impliquées dans la régénération hépatique, avec un intérêt tout particulier pour l'EGFR et ses voies en aval. Pour finir, nous avons pratiqué des expériences de sauvetage phénotypique par injections d'hormone de croissance afin de véritablement incriminer la voie de signalisation étudiée.

Title: GH administration rescues fatty liver regeneration impairment by restoring GH/EGFR pathway deficiency

Collin de l'Hortet, A.^{1,2,3}, Zerrad-Saadi, A.^{1,2,3}, Prip-Buus, C.^{1,2,3}, Fauveau, V.^{1,2,3}, Helmy, N.^{1,2,3,4}, Zioli, M.⁵, Vons C.^{1,2,3,4}, Billot, K.^{1,2,3}, Baud, V.^{1,2,3}, Gilgenkrantz, H.^{1,2,3*}, Guidotti, J-E^{1,2,3*}.

¹ INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France.

² CNRS, UMR8104, Paris, France.

³ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine Paris, France.

⁴ Service de Chirurgie Digestive et Métabolique, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, Hôpital Jean Verdier, Bondy, France.

* H.G. and J-E.G. contributed equally to this work, co-corresponding authors

Abbreviated title: GH rescues fatty liver regeneration defect

Keywords: liver regeneration, NASH, GH, EGFR

Word count: 3738 words

Correspondence and reprint requests should be addressed to:

Dr Hélène Gilgenkrantz and Jacques-Emmanuel Guidotti, Département Développement, Reproduction et Cancer, Institut Cochin, 24 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France; helene.gilgenkrantz@inserm.fr and jacques-emmanuel.guidotti@inserm.fr

Grants and Fellowship: This study was supported by the Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF). ACH received a fellowship from LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

Abstract

Growth hormone (GH) pathway has been shown to play a major role in liver regeneration through the control of EGFR activation. This pathway is downregulated in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Since regeneration is known to be impaired in fatty livers, we wondered whether a deregulation of the growth hormone/EGFR pathway could explain this deficiency.

Hepatic EGFR expression and triglyceride levels were quantified in liver biopsies of thirty-two obese patients with different degrees of steatosis. We showed a significant inverse correlation between liver EGFR expression and the level of hepatic steatosis. GH/EGFR downregulation was also demonstrated in two steatosis mouse models, a genetic (*ob/ob*) and a methionine and choline deficient (MCD) diet mouse model, in correlation with liver regeneration defect. *Ob/ob* mice exhibited a more severe liver regeneration defect after partial hepatectomy (PH) than MCD diet fed mice, a difference that could be explained by a decrease in STAT3 phosphorylation 32h after PH.

Having checked that GH deficiency accounted for the GH signaling pathway downregulation in the liver of *ob/ob* mice, we showed that GH administration in these mice led to a partial rescue in hepatocyte proliferation after partial hepatectomy associated with a concomitant restoration of liver EGFR expression and STAT3 activation.

In conclusion, we propose that the GH/EGFR pathway downregulation is a general mechanism responsible for liver regeneration deficiency associated with steatosis, which could be partially rescued by GH administration.

Introduction

In recent decades, the incidence of hepatic steatosis, characterized by hepatic triglyceride (TG) accumulation, has increased dramatically in developed countries, with the growing epidemic of obesity. Steatosis, a hallmark of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is often associated with obesity, insulin resistance and type II diabetes. This fatty infiltration predisposes the liver to the development of chronic inflammation and oxidative stress leading to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), an increasingly major cause of liver dysfunction, progressing to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in western countries¹. It is estimated that around 30% of patients scheduled for liver resection have steatosis and these patients show a higher incidence of complications and mortality after such resection^{2,3}. Although hepatocyte proliferation after liver resection has never been analyzed thoroughly in humans, two recent studies using computed tomography have suggested that obesity⁴ or liver steatosis⁵ was correlated with volumetric liver recovery defect. Hepatocyte proliferation defect post partial hepatectomy (PH) has been demonstrated in rodent steatosis models, induced either by genetic mutation; such as the leptin-deficient (*ob/ob*)^{6,7,8}, leptin resistant (*db/db* mice and Zucker rats)^{9,10} and diabetic KK-Ay mice¹¹; or by diets such as high fat diet (HFD)¹², high fructose diet¹³ or methionine and choline deficient (MCD) diet¹⁴. Although these studies mostly confirm defective liver regeneration after PH, the mechanisms involved are far from clear. Understanding why the regeneration is impaired in fatty liver diseases is therefore of major clinical interest.

Steatosis, along with insulin resistance, is correlated with a downregulation of the growth hormone (GH) pathway, GH serum concentration being low in NAFLD patients^{15,16} as well as in obese patients¹⁷. Inversely, NAFLD often accompanies adult GH deficiency¹⁸. We have previously demonstrated, using GH receptor inactivated mice (GHRKO), that a drastic downregulation of liver EGFR expression is sufficient to explain the impaired hepatic regeneration induced by GH blockade¹⁹. We now postulate that GH/EGFR pathway deficiency could represent a more generalized mechanism explaining liver regeneration deficiency beyond a certain level of steatosis. We addressed this question by analyzing liver regeneration in two commonly used mouse models of liver steatosis, the *ob/ob* mice, a genetic model associated with hyperphagia and obesity, with no steatohepatitis, and MCD diet, which induces steatosis, leading to steatohepatitis in association with weight loss.

We demonstrate that liver EGFR expression is downregulated before and during regeneration in both models. Moreover, we observe an inverse correlation between EGFR expression and liver steatosis in human liver biopsies. Finally, we demonstrate that GH treatment can rescue hepatocyte proliferation in *ob/ob* mice.

Material and methods

Animals

Male C57BL/6 *ob/ob* and wild type mice, purchased from C. River Laboratories (L'Arbresle, France), were maintained in a dedicated pathogen-free facility under a 12h light/dark cycle with free access to food and water. A MCD diet (MP Biomedicals, Solon, OH) was given *ad libitum* to C57BL/6 male mice for 5 weeks from 8 weeks of age. GHRKO mice were obtained J. Kopchick (Athens, OH)²⁰ and kept under the same conditions.

Surgical procedures and animal manipulation

A 55% PH was performed following a modified protocol of 66% hepatectomy²¹. Under isoflurane anesthesia, the left lateral lobe and the right portion of the median lobe were sequentially removed. Four to six 13 to 14 week old male mice were used in each group and at each time point. The animals were killed 8h, 24h, 32h, 44h, 56h or 68h after hepatectomy. All experiments were conducted in accordance with European and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and accepted under the reference number CEEA34.HG.110.12. The liver was harvested either into formalin for histological evaluation and proliferation studies, or snap frozen in liquid nitrogen for both mRNA and protein preparations. Bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was either injected intraperitoneally at 50 mg/kg, 2h before sacrifice in the kinetic study or provided in the drinking water at 2mg/mL from the moment of hepatectomy until the end of the experiment.

For GH treatments, two initial intraperitoneal injections of 4µg/g body weight of recombinant human GH (Ipsen Pharma, Boulogne-Billancourt, France) were administered 9h and 1h before hepatectomy. Subsequent human GH injections were given every 8h at 3µg/g body weight until the end of the experiment, following a protocol adapted from²².

Human liver biopsies

Frozen liver biopsy samples from obese patients, who underwent bariatric surgery, were provided by Jean Verdier liver disease Biobank (CRB Maladie du foie, Groupe Hospitalo-universitaire Paris Seine Saint-Denis GHPSSD). All patients gave their written informed consent prior to liver biopsy. The

study was approved by the Ethic Committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France X No. 2010/02/02). Patients infected with hepatitis B or hepatitis C and/or patients presenting an alcoholic consumption (>30g/day for males; >20g/day for females) were excluded from the study. Steatosis was semi-quantitatively graded on hematoxylin and eosin stained paraffin sections according to the percentage of hepatocyte with steatosis (0:<5%; 1: [5-10%]; 2:[11-33%]; 3:[34-66%]; 4:[67-100%]).

Histological analysis in mice

Paraffin-embedded sections (3µm) were used for immunochemistry analysis. Immunostaining was performed using a biotinylated monoclonal primary anti-bromodeoxyuridine antibody (DAKO, Glostrup, Denmark), followed by a secondary anti-mouse antibody with an avidin–biotin complex (Vector, Burlingame, USA) and enhanced with the Vectastain Elite ABC kit (Vector, Burlingame, USA). Alternatively, a primary anti–phospho-histone H3 (Merck Millipore, Billerica, MA) was used followed by an anti-rabbit secondary HRP antibody (DAB Kit, Vector Laboratories). These sections were revealed by diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Kit, Vector Laboratories) and haematoxylin. Approximately 5,000 to 8,000 hepatocytes were counted on 10 images per animal at 200x magnification using ImageJ software.

Phospho-histone H3 staining was used to detect the G2 and the M phase. The G2 cells could be distinguished by their typical patchy nuclei, in contrast to the recognizable staining for mitosis (M) figures.

Real-Time RT-PCR

RNA was isolated and reverse transcribed following a protocol previously described¹⁹. Real Time PCR was performed in duplicate using QuantiTech SYBR Green PCR kit (Qiagen, Mainz, Germany) on a Light Cycler (Roche, Mannheim, Germany). Pre-designed QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Mainz, Germany) were used to amplify all genes using the standard QuantiTect protocol. Relative expression was calculated after normalizing to the expression of the housekeeping gene hypoxanthine phosphorybosyltransferase (HPRT). A wild-type (WT) quiescent control liver served as calibrator sample for the calculation of fold induction in gene expression.

Western Blot

Total protein extracts were obtained from snap-frozen tissue by homogenization in lysis buffer ²³. Membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: Mouse anti-Phospho-EGFR-1148, Phospho-Akt-ser473, Phospho-p44/42 MAPK, Phospho-STAT3, Phospho-STAT5-A/B, EGFR, AKT, Erk1/2, STAT3, STAT5 were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), and Cyclin-A were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), and γ - tubulin-GTU-88 was from Sigma (St Louis, MO). The signal was amplified either by an anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (GE Health-care, Buckinghamshire, UK). Proteins were revealed using the SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce, Rockford, USA). Blots were scanned for densitometry analysis with ImageJ software.

Triglyceride content in mice and human liver

Liver triglyceride contents were measured with a colorimetric diagnostic kit (Diasys, Holzheim, Germany) following extraction of total liver lipids with chloroform/methanol (2:1, v/v) and their separation by thin-layer chromatography on silica-gels plates (Merck Millipore, Billerica, MA).

Measurement of serum GH

Serum GH concentration was determined using a Rat/Mouse GH sandwich Elisa quantification Kit (Merck Millipore, Billerica, MA). Each sample was measured in duplicate.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Prism Software (GraphPad) using the non-parametric Mann-Whitney test. Correlations were assessed by linear regression. Data are presented as mean \pm SEM, with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

Results

Hepatic GH pathway downregulation and liver regeneration deficiency in steatotic mouse liver

Ob/ob mice have lower levels of circulating GH compared to lean mice²⁴, consistent with the GH deficiency observed in obese patients^{25,26}. To determine if it was also the case in MCD diet model, and to demonstrate that the hepatic downstream GH pathway was consequently inhibited, we measured serum GH and quantified the liver transcript levels of 3 major hepatic GH targets - insulin-like growth factor 1 (IGF1), acid labile subunit (ALS) and suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) - in *ob/ob* mice and in mice having received a MCD diet (Fig.1A,B,C). We showed serum GH decrease in MCD mice and observed a significant downregulation of all GH target transcripts in both models as it was previously described in the liver of mice with a GH deficient pathway^{19,27}.

Due to the previously described high mortality rate of *ob/ob* mice following 70% PH⁸, we performed a less extensive 55% resection in *ob/ob* mice and in MCD mice (see Materials and Methods). The proportion of S-phase hepatocytes at different time points after PH was measured by BrdU incorporation (Fig.2A,B,G). As observed for 2/3 PH, WT mice showed a synchronized S-phase entry after 55% resection, characterized by a peak of BrdU incorporation at around 44h. Compared to control mice, liver regeneration was delayed in both models and deeply impaired in *ob/ob* mice. The peak of proliferation was observed 56h after PH in both steatosis models. This maximal BrdU-positive hepatocyte percentage reached only 1/8 of the WT level in *ob/ob* mice. Analysis of cyclin A expression, a typical marker of S-phase, showed a drastic reduction in both models of steatosis at 44h, 56h and 68h, confirming the BrdU incorporation results (Fig.2E,F). The mitotic index, assessed by pHH3 staining, was also significantly lower in steatosis compared with control mice as early as 44h after PH (Fig. 2G). From 44h to 56h, the frequency of hepatocytes in the G2/M phase of the cell cycle is already decreasing in WT regenerating livers while it continues to increase in *ob/ob* and MCD mice. At the peak, the percentage of G2/M figures remained very low in *ob/ob* mice (1/7 of the WT level), while the peak is delayed in MCD mice (Fig. 2C,D).

Finally, the liver weight to body weight (LW/BW) ratio of MCD mice returned to the WT level 68h after PH. In contrast, the LW/BW of *ob/ob* mice remained significantly lower (Fig. 2H, I), comforting the observation that liver regeneration was impaired at a higher degree in *ob/ob* mice than

in MCD mice.

These experiments show that the regenerative response to PH is impaired in *ob/ob* mice and significantly delayed in MCD mice, the progression from G1 to S-phase being hampered in both cases.

Liver steatosis is correlated with hepatic EGFR expression deficiency in mice and human

Progression through the G1 phase of the cell cycle, which occurs between 8h and 32h after PH, mainly involves two receptors, EGFR and c-Met. While there was no difference in c-Met liver mRNA expression between the experimental groups (data not shown), EGFR transcript (Fig. 3A,B) and protein (Fig. 3C-F) were barely detectable in the resting liver of both mouse models of steatosis. Interestingly, we found an inverse correlation between EGFR liver expression and triglyceride (TG) content in both mouse models (Fig. 3G).

We then investigated whether such an inverse correlation could be observed in patients with steatosis. Thirty-two obese subjects (7 males/25 females; BMI> 30kg/m²), ranging from 25- to 58-year-old were enrolled in this study. For each patient, we quantified hepatic EGFR expression from western blot analysis and we evaluated the degree of liver steatosis both histologically and by measuring the TG content. As expected, hepatic steatosis was not correlated to the level of obesity (data not shown). We showed a significant inverse correlation ($R^2=0.41$, $p<10^{-5}$) between the liver TG content and the magnitude of EGFR protein expression (Fig. 4).

Finally, we wondered whether this drastic downregulation persisted during regeneration in both mouse models, specifically during the first 32h after PH. Neither EGFR induction of expression nor activation (phosphorylation) was observed in *ob/ob* or MCD mice at any time point (Fig. 3E,F). We previously found a sustained transcription of EGFR ligands during liver regeneration in GHRKO mice¹⁹. We therefore analyzed the transcription of two ligands, amphiregulin and HB-EGF, 24h to 32h post PH in *ob/ob* and MCD livers. Their up regulation during the regeneration process, as in GHRKO mice, confirmed the deregulation of the EGFR pathway in both models of hepatic steatosis (Supp Fig. 1).

We analyzed three major signaling pathways downstream of EGFR, Erk1/2, Pi3K/Akt and STAT3. For Erk1/2 expression, or phosphorylation, we observed no difference between *ob/ob* or

MCD mice and WT mice (Supp Fig. 2A,B,C). Enhanced Akt activation was observed both in *ob/ob* and MCD livers, present before PH and throughout the time points (Supp Fig. 2A,B,C). Since Akt activation has been required for hepatocyte proliferation or for hepatocyte cell size during liver regeneration^{28,29}, this cannot account for the regenerative deficiency. Moreover, as previously described⁷, we observed a higher level of STAT3 phosphorylation (p-STAT3) in *ob/ob* mice compared to WT, from 0 to 24 h after PH (Supp Fig. 2A,C). This upregulation was also present in MCD mice (Supp Fig. 2B,C). As it has been recently shown that increased Socs3 expression, under the control of STAT3 activation, is responsible for impaired liver regeneration^{30,31}, we measured Socs3 mRNA expression and observed no upregulation, either in *ob/ob* or MCD liver (Supp Fig. 2D). This suggests that this increased STAT3 phosphorylation during the first 24h post-PH cannot account for the hepatocyte DNA synthesis defect. Conversely, while WT mice showed sustained p-STAT3 32h after PH, this activation was not observed in *ob/ob* mice independently of the STAT3 expression, which remained stable. Therefore, this deficiency in STAT3 activation could be involved in the regeneration impairment in this model.

Our results show that the downregulation of the GH/EGFR pathway is a general observation in steatotic liver. Although, the intracellular targets remain to be clearly identified, we suggest that this pathway defect participates in the blockade of hepatocytes to enter the G1/S transition phase.

Human GH treatment of *ob/ob* mice increases regenerating hepatocyte proliferation

We then wondered whether human GH would rescue the regeneration defect phenotype and restore hepatocyte proliferation in *ob/ob* mice. We first demonstrated that GH signaling is not desensitized in this model, in showing a restoration of STAT5 activation, the main effector of GH signaling pathway, after GH administration. In contrast to WT mice, STAT5 activation is barely detectable in the quiescent liver of *ob/ob* mice, corroborating the downregulation of the GH pathway in this model. Our GH administration protocol was sufficient to restore the total activation of STAT5 (p-STAT5) in the liver of *ob/ob* GH-treated mice (Fig. 5A). Human GH is known to also activate the murine prolactin receptor (PRLr). However, recent data demonstrate that PRLr deficient mice do not show liver regeneration impairment³². Nevertheless, to be sure that human GH did not restore STAT5

activation independently of GHR pathway, notably by PRL compensatory pathway, we injected human GH in GHRKO mice. We observed barely detectable induction of STAT5 in GHRKO mice injected with human GH, compared to WT and *ob/ob* mice using the same GH administration protocol (Fig. 5A). This result shows that delivery of human GH activates STAT5 pathway in the mouse liver mainly through the GHR. This result was coherent with previous published data ³³.

We then compared hepatocyte proliferation in *ob/ob* mice that had been injected with human GH just before and during the regenerative process with non-treated *ob/ob* mice (Fig. 5B). GH being involved in lipid processes in the liver, we first confirmed that human GH administration, during a short period of time, did not modify the level of liver steatosis, assessed by the measurement of the liver TG content before and at the end of the liver regeneration process (Fig. 5C).

Using BrdU in drinking water from the time of PH up to the end of the experiment, 68h after PH, we then found that cumulative hepatocyte DNA synthesis was significantly increased (6-fold) in GH-treated *ob/ob* mice compared to non-treated mice (Fig. 5D,E). It corresponds to about 1/3 that of lean mice. Moreover, the LW/BW ratio of GH-treated *ob/ob* mice returned to normal levels 68h after PH indicating an efficient regeneration in *ob/ob* mice injected with GH (Fig. 5F).

The partially rescued hepatocyte proliferation correlates with a restoration of liver EGFR expression both at the time of PH and at the end of the G1 phase (32h post PH) at transcriptional and protein levels (Fig. 5G,H, Suppl Fig. 3). Interestingly, the rescue of EGFR expression was combined with EGFR activation notably detected 32h post PH (Suppl Fig 3).

We then wondered if GH injections in *ob/ob* mice would also rescue STAT3 phosphorylation at the same timing. Indeed, concomitantly to EGFR re-induction 32h after PH, we observed a rescue of STAT3 phosphorylation, in GH-treated *ob/ob* mice compared to non-treated mice (Suppl Fig. 3). Since STAT3 is one of the main targets downstream of EGFR, this result could indicate that GH rescues STAT3 phosphorylation, through the restoration of EGFR activation.

Discussion

While numerous experimental studies have found that liver regeneration is impaired in steatotic livers, diverging hypotheses have been proposed to explain this phenomenon. In the present paper, we propose that a GH/EGFR pathway deregulation is a mechanism that could account for this liver regeneration deficiency. We first observed that transcriptional targets downstream of the GH pathway are severely downregulated in two models of liver steatosis, leptin-deficient *ob/ob*, and methionine-choline deficient diet (MCD) mice. These two models differ mainly in two aspects, the presence (*ob/ob*) or absence (MCD) of obesity and the presence (MCD) or absence (*ob/ob*) of steatohepatitis. We show here a drastic reduction of liver EGFR expression in both models, as it was previously observed in GHR- and in STAT5-inactivated mice ^{19,34}. Most importantly, we found that EGFR expression is affected according to the level of steatosis not only in mice models, but also in steatotic human liver as well. To our knowledge, it is the first time that EGFR expression is demonstrated to be inversely correlated to the triglycerides content in human liver samples. It is tempting to speculate that this EGFR downregulation is the consequence of the reduced GH signaling pathway activation.

In contrast, liver regeneration has been shown to occur normally in some mild hepatic steatosis models, such as choline deficient or orotic-acid fed rats ³⁵, leading some investigators to speculate that the degree of steatosis is important in determining the effect on liver regeneration ^{36,14}. This could also explain why the liver regeneration deficiency varies in MCD-fed mice, a phenotype depending on the magnitude of steatosis ³⁷, and in HFD-induced steatosis ^{12,38}. In our hands, the delay in liver regeneration observed in MCD mice was associated with EGFR deficiency.

Failure of fatty *ob/ob* hepatocytes to enter S-phase after PH has already been reported ^{6,7,8}. We focused our study on this step of the liver regeneration process that occurs in the first 32h after hepatectomy, in two models of steatosis, *ob/ob* and MCD mice. The present study shows that EGFR is neither re-induced nor activated during this critical period of liver regeneration in any of the models. We feel this new insight can reconcile previously conflicting results on liver regeneration in various models of steatosis.

All data converge to indicate that EGFR is a critical regulator for the S-phase entry of hepatocytes in the first steps of the liver regeneration process after PH ^{39,40,41}. However, the signaling pathways involved downstream of EGFR are still not entirely elucidated. Neither AKT nor STAT3

upregulation during the first 24h post-PH can explain the liver regeneration defect and STAT3 phosphorylation was not followed by an increase of SOCS3 expression. In contrast, impaired regenerating rat liver with EGFR expression silenced by specific short hairpin siRNAs shows a STAT3 transcriptional downregulation 24h after PH⁴². A STAT3 phosphorylation defect was observed 32h after PH in *ob/ob* mice that could therefore participate to the regeneration impairment in an EGFR dependent manner. This hypothesis is reinforced by the recovery of both EGFR expression and STAT3 activation at 32h post-PH in mice treated with human GH. It would be interesting to determine whether the inflammatory pathways known to be upregulated in MCD livers⁴³ maintain STAT3 phosphorylation at this time of liver regeneration, thus leading to a less marked regeneration defect.

Having demonstrated that GH signaling can be activated in the liver of *ob/ob* mice, we showed that GH delivery allows hepatocytes to overpass the G1 check-point blockade and thus significantly increases hepatocyte proliferation after PH in *ob/ob* mice. This increase is associated with the expression and activation of EGFR, confirming our hypothesis that the GH/EGFR axis plays a major role in the regeneration deficiency observed in liver steatosis.

Our study has therefore identified EGFR as a major altered pathway involved in the reduced hepatocyte BrdU incorporation in *ob/ob* and MCD hepatocytes after PH. We and others have already reported a crosstalk between GH and EGFR pathway^{44,45,19}. Mice deleted for STAT5 in the liver display a reduced EGFR expression level³⁴. Interestingly, phosphorylated STAT5 expression, which was downregulated in the liver of *ob/ob* mice, was restored after GH injection, supporting the hypothesis that STAT5, as the main effector of GH, controls EGFR mRNA expression in the liver.

In summary, we propose that, beyond a certain threshold of steatosis, GH/EGFR pathway downregulation is a common mechanism involved in the regeneration deficiency of steatotic liver, a hypothesis strengthened by the negative correlation in human liver samples between EGFR expression level and TG content. Deficiencies in hepatocyte G1/S progression and EGFR downregulation are restored by GH administration. STAT5 induction after GH administration shows that fatty hepatocytes are not resistant to GH and that GH injections have beneficial effects on hepatocyte proliferation, independently of TG accumulation. GH therapy is currently being investigated for a variety of clinical

indications that are not limited to dwarfism, including visceral adiposity⁴⁶ or HIV-induced lipodystrophy⁴⁷. However, chronic GH administration can lead to various negative side effects. Our data suggest that a short period of GH administration could have a therapeutic interest for liver regeneration, when large resections of fatty liver are required.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Michel Polak and Ipsen Pharma (Boulogne-Billancourt, France) for providing recombinant GH, John J. Kopchick for giving us the GHrKO mouse strain, Vincent Goffin (Faculté de Médecine, Inserm, U845, Research Center Growth and Signaling, Université Paris Descartes, Paris, France) for critical reading of the manuscript, as well as the Animal and Histology, Immunostaining and Laser Microdissection facilities of Cochin Institute.

This study was supported by the Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF).

ACH received a fellowship from LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer).

Figure Legends

Figure 1. Downregulation of GH pathway in *ob/ob* and MCD mice

Serum GH Concentration in ng/ml (A) and relative hepatic mRNA expression of liver representative GH target-genes: IGF-1, ALS and SOCS 2 compared to controls and assessed by means of qRT-PCR ($n \geq 6$ /genotype) in *ob/ob* (B) and MCD (C) mice. All assays were performed in duplicate. * $p < 0.05$.

Figure 2. Kinetics of hepatocyte proliferation after PH in WT, *ob/ob* and MCD mice

A, B. Quantification of the percentage of labeled hepatocytes 2h after BrdU injection at different time points after PH ($n \geq 4$ /genotype and time point).

C, D. Proportion of hepatocytes undergoing G2/mitosis at different time points after PH quantified on PHH3 immuno-stained sections. 1 corresponds to the maximal level observed in WT animals 44h after PH ($n \geq 4$ /genotype and time point).

E, F. Western blot analysis of Cyclin A at different time points after PH. γ -tubulin was used as a loading control.

G. Representative liver sections showing immunohistochemical detection of BrdU and PHH3 in WT, *ob/ob* and MCD mice 44h after PH. Original magnification x200.

H, I. Normalized liver weight (LW) to body weight (BW) ratio at 0h and 68h post PH in *ob/ob* and MCD mice compared to WT mice. LW/BW ratio was normalized so that 1 corresponds to the mean LW/BW ratio before operation for each group. * $p < 0.05$.

Figure 3. Expression of EGFR in regenerating steatotic livers

A, B. Quantification of liver EGFR mRNA expression measured by qRT-PCR in quiescent *ob/ob* (A) and MCD (B) livers compared to WT. * $p < 0.05$.

C, D. Western blot analysis quantification of total EGFR in the quiescent liver of two representative *ob/ob* (C) and MCD (D) mice compared to controls livers. γ -tubulin was used as a loading control.

E, F. Western blot analysis of total EGFR and phospho (p1148)-EGFR at indicated time points after PH in *ob/ob* (E) and MCD (F) mice compared to WT. γ -tubulin was used as a loading control.

G. EGFR expression analyzed by western blot in WT, *ob/ob* and MCD livers with TG content indicated above. * $p < 0.05$.

Figure 4. Relationship between EGFR expression and steatosis in human liver samples

A. EGFR protein expression was correlated with the total liver TG content in obese patients liver samples.

B. EGFR expression analyzed by western blot in representative human liver samples with TG content indicated above. γ -tubulin was used as a loading control.

Figure 5. GH treatment rescues hepatocyte proliferation in *ob/ob* mice

A. Western blot analysis for p-STAT5/total STAT5 ratio in WT, WT +GH, *ob/ob*, *ob/ob* +GH, GHRKO and GHRKO +GH mice 30 minutes after GH injection.

B. Schematic illustration of the experimental design. GH-treated *ob/ob* mice were injected twice before PH and then every 8h until sacrifice. All mice had access to drinking water containing BrdU from the time of PH until the end of the experiment.

C. Liver TG content at indicated times after PH in GH-treated and non-GH-treated *ob/ob*

D, E. BrdU immunohistochemistry and quantification of the percentage of labeled hepatocytes 68h after PH, BrdU being administered in drinking water from the time of PH until the end of the experiment (n=5/genotype and time point).

F. Normalized liver weight (LW) to body weight (BW) ratio at 68h post PH in *ob/ob* and *ob/ob* +GH mice. LW/BW ratio was normalized so that 1 corresponds to the mean LW/BW ratio before operation for each group. * $p < 0.05$.

G. Expression of EGFR assessed by qRT-PCR in the liver of GH-treated *ob/ob* compared to WT at the time of PH. * $p < 0.05$

H. Western blot analysis of total liver EGFR at the time of PH in WT mice, non-GH-treated and GH-treated *ob/ob* mice.

Supporting figure 1. Expression of growth factors during liver regeneration, Amphiregulin (AREG) and HB-EGF mRNA relative levels measured by qRT-PCR before (0) and at indicated time points after PH in A, *ob/ob* and B MCD, compared to WT mice. *p<0.05.

Supporting figure 2. Downstream EGFR pathways during G1/S transition phase of liver regeneration

A. B. Representative Western blot analysis of phosphorylated (p) and total STAT3, Akt and Erk1/2 expression in *ob/ob* (A), and MCD (B) livers at different time points after PH compared to WT mice. γ -tubulin was used as a loading control.

C. Quantification of western blot analysis for p-STAT3/total STAT, p-AKT/total AKT, p-Erk1/total Erk1 and p-Erk2/total Erk2 ratio in WT, *ob/ob* MCD mice. *p<0.05

D. Relative hepatic mRNA expression of SOCS3 in *ob/ob* mice compared to controls and assessed by means of qRT-PCR ($n \geq 4$ /genotype). All assays were performed in duplicate. *p<0.05.

Supporting figure 3. Western Blot analysis of EGFR pathway in GH-treated mice

Representative Western blot analysis and its quantification of phosphorylated (p) and total EGFR, phosphorylated (p) and total STAT3, in WT, *ob/ob* and *ob/ob* +GH mice at 32h after PH. γ -tubulin was used as a loading control.

Bibliography

1. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002;123(1):134–140. doi:10.1053/gast.2002.34168.
2. Gomez D, Malik HZ, Bonney GK, Wong V, Toogood GJ, Lodge JP a, Prasad KR. Steatosis predicts postoperative morbidity following hepatic resection for colorectal metastasis. *Br J Surg*. 2007;94(11):1395–402. doi:10.1002/bjs.5820.
3. McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien P-A. Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg*. 2007;245(6):923–30. doi:10.1097/01.sla.0000251747.80025.b7.
4. Truant S, Bouras AF, Petrovai G, Buob D, Ernst O, Boleslawski E, Hebbar M, Pruvot F-R. Volumetric gain of the liver after major hepatectomy in obese patients: a case-matched study in 84 patients. *Ann Surg*. 2013;258(5):696–704. doi:10.1097/SLA.0b013e3182a61a22.
5. Kele PG, van der Jagt EJ, Gouw ASH, Lisman T, Porte RJ, de Boer MT. The impact of hepatic steatosis on liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver Int*. 2013;33(3):469–75. doi:10.1111/liv.12089.
6. Yang SQ, Lin HZ, Mandal a K, Huang J, Diehl a M. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology*. 2001;34(4 Pt 1):694–706. doi:10.1053/jhep.2001.28054.
7. Torbenson M, Yang SQ, Liu HZ, Huang J, Gage W, Diehl AM. STAT-3 overexpression and p21 up-regulation accompany impaired regeneration of fatty livers. *Am J Pathol*. 2002;161(1):155–61. doi:10.1016/S0002-9440(10)64167-3.
8. Leclercq I a, Vansteenbergh M, Lebrun VB, VanHul NK, Abarca-Quinones J, Sempoux CL, Picard C, Stärkel P, Horsmans YL. Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin. *Lab Invest*. 2006;86(11):1161–71. doi:10.1038/labinvest.3700474.
9. Yamauchi H, Uetsuka K, Okada T, Nakayama H, Doi K. Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2003;54(4):281–6. doi:10.1078/0940-2993-00265.
10. Selzner M, Clavien P a. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*. 2000;31(1):35–42. doi:10.1002/hep.510310108.
11. Aoyama T, Ikejima K, Kon K, Okumura K, Arai K, Watanabe S. Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A(y) mice. *Hepatology*. 2009;49(5):1636–44. doi:10.1002/hep.22828.
12. DeAngelis R a, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology*. 2005;42(5):1148–57. doi:10.1002/hep.20879.
13. Tanoue S, Uto H, Kumamoto R, Arima S, Hashimoto S, Nasu Y, Takami Y, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(1):163–8. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.131.
14. Veteläinen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg*. 2007;245(1):44–50. doi:10.1097/01.sla.0000225253.84501.0e.
15. Lonardo A, Loria P, Leonardi F, Ganazzi D, Carulli N. Growth Hormone Plasma Levels in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(4):1071–1072.
16. Xu L, Xu C, Yu C, Miao M, Zhang X, Zhu Z, Ding X, Li Y. Association between serum growth hormone levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *PLoS One*. 2012;7(8):e44136. doi:10.1371/journal.pone.0044136.
17. Veldhuis JD, Weltman A, Abbott R, Mulligan T, Johnson ML, Pincus SF, Straume M, Hill C, Carolina N, McGuire HH. Impact of Age, Sex Steroid Hormones, and Obesity on Basal Versus Pulsatile Growth Hormone Secretion in Men Assessed in an Ultrasensitive Chemiluminescence Assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(11):3209–3222.

18. Ichikawa T, Hamasaki K, Ishikawa H, Ejima E, Eguchi K. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatic steatosis in patients with adult onset growth hormone deficiency. *Gut*. 2003;52(6):912–3.
19. Zerrad-Saadi A, Lambert-Blot M, Mitchell C, Bretes H, Collin de l'Hortet A, Baud V, Chereau F, Sotiropoulos A, Kopchick JJ, Liao L, Xu J, Gilgenkrantz H, Guidotti J-E. GH receptor plays a major role in liver regeneration through the control of EGFR and ERK1/2 activation. *Endocrinology*. 2011;152(7):2731–41. doi:10.1210/en.2010-1193.
20. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13215–20.
21. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1167–70. doi:10.1038/nprot.2008.80.
22. Krupczak-Hollis K, Wang X, Dennewitz MB, Costa RH. Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through forkhead box m1b. *Hepatology*. 2003;38(6):1552–62. doi:10.1016/j.hep.2003.08.052.
23. Guidotti J-E, Br  gerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(21):19095–101. doi:10.1074/jbc.M300982200.
24. Luque RM, Kineman RD. Impact of obesity on the growth hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology*. 2006;147(6):2754–63. doi:10.1210/en.2005-1549.
25. Williams T, Berelowitz M, Joffe SN, Thorner MO, Rivier J, Vale W, Frohman LA. Impaired growth hormone responses to growth hormone-releasing factor in obesity. A pituitary defect reversed with weight reduction. *N Engl J Med*. 1984;311(22):1403–7. doi:10.1056/NEJM198411293112203.
26. Pijl H, Langendonk JG, Burggraaf J, Fr  lich M, Cohen AF, Veldhuis JD, Meinders AE. Altered Neuroregulation of GH Secretion in Viscerally Obese Premenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(11):5509–5515.
27. Amador-Noguez D, Yagi K, Venable S, Darlington G. Gene expression profile of long-lived Ames dwarf mice and Little mice. *Aging Cell*. 2004;3(6):423–41. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00125.x.
28. Jackson LN, Larson SD, Silva SR, Rychahou PG, Chen LA, Qiu S, Rajaraman S, Evers BM. PI3K/Akt activation is critical for early hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(6):G1401–10. doi:10.1152/ajpgi.00062.2008.
29. Haga S, Ozaki M, Inoue H, Okamoto Y, Ogawa W, Takeda K, Akira S, Todo S. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology*. 2009;49(1):204–14. doi:10.1002/hep.22583.
30. Vaquero J, Campbell JS, Haque J, McMahan RS, Riehle KJ, Bauer RL, Fausto N. Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88 provide mechanistic insights into the cause and effects of interleukin-6 activation in mouse liver regeneration. *Hepatology*. 2011;54(2):597–608. doi:10.1002/hep.24420.
31. Da Silva CG, Studer P, Skroch M, Mahiou J, Minussi DC, Peterson CR, Wilson SW, Patel VI, Ma A, Csizmadia E, Ferran C. A20 promotes liver regeneration by decreasing SOCS3 expression to enhance IL-6/STAT3 proliferative signals. *Hepatology*. 2013;57(5):2014–25. doi:10.1002/hep.26197.
32. Moreno-Carranza B, Goya-Arce M, Vega C, Ad  n N, Triebel J, López-Barrera F, Quintanar-St  phano A, Binart N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(7):R720–6. doi:10.1152/ajpregu.00282.2013.
33. Le Stunff C, Gronowski M, Rotwein P. Contrasting acute in vivo nuclear actions of growth hormone and prolactin. *Mol Cell Endocrinol*. 1996;121(2):109–17.

34. Blaas L, Kornfeld J-W, Schramek D, Musteanu M, Zollner G, Gumhold J, van Zijl F, Schneller D, Esterbauer H, Egger G, Mair M, Kenner L, Mikulits W, Eferl R, Moriggl R, Penninger J, Trauner M, Casanova E. Disruption of the growth hormone-signal transducer and activator of transcription 5-insulinlike growth factor 1 axis severely aggravates liver fibrosis in a mouse model of cholestasis. *Hepatology*. 2010;51(4):1319–26. doi:10.1002/hep.23469.
35. Rao MS, Papreddy K, Abecassis M, Hashimoto T. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci*. 2001;46(9):1821–6.
36. Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Van den Berge V, Horsmans Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*. 2002;36(5):645–52.
37. Donthamsetty S, Bhawe VS, Mitra MS, Latendresse JR, Mehendale HM. Nonalcoholic fatty liver sensitizes rats to carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Hepatology*. 2007;45(2):391–403. doi:10.1002/hep.21530.
38. Sydor S, Gu Y, Schlattjan M, Bechmann LP, Rauhen U, Best J, Paul A, Baba H a, Sowa J-P, Gerken G, Canbay A. Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab Invest*. 2013;93(1):20–30. doi:10.1038/labinvest.2012.142.
39. Natarajan A, Wagner B, Sibilio M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(43):17081–6. doi:10.1073/pnas.0704126104.
40. Paranjpe S, Bowen WC, Tseng GC, Luo J-H, Orr A, Michalopoulos GK. RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats. *Am J Pathol*. 2010;176(6):2669–81. doi:10.2353/ajpath.2010.090605.
41. Collin de l'Hortet A, Gilgenkrantz H, Guidotti J-E. EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration. *Int J Hepatol*. 2012;2012:476910. doi:10.1155/2012/476910.
42. Paranjpe S, Bowen WC, Tseng GC, Luo J-H, Orr A, Michalopoulos GK. RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats. *Am J Pathol*. 2010;176(6):2669–81. doi:10.2353/ajpath.2010.090605.
43. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol*. 2004;40(1):47–51. doi:10.1016/j.jhep.2003.09.020.
44. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, Honjo M, Takahashi M, Takahashi T, Hirai H, Tsushima T, Akanuma Y, Fujita T, Komuro I, Yazaki Y, Kadowaki T. Growth hormone-induced tyrosine phosphorylation of EGF receptor as an essential element leading to MAP kinase activation and gene expression. *Endocr J*. 1998;45 Suppl:S27–31.
45. González L, Díaz ME, Miquet JG, Sotelo AI, Fernández D, Dominici FP, Bartke A, Turyn D. GH modulates hepatic epidermal growth factor signaling in the mouse. *J Endocrinol*. 2010;204(3):299–309. doi:10.1677/JOE-09-0372.
46. Savastano S, Di Somma C, Angrisani L, Orio F, Longobardi S, Lombardi G, Colao A. Growth hormone treatment prevents loss of lean mass after bariatric surgery in morbidly obese patients: results of a pilot, open, prospective, randomized, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(3):817–26. doi:10.1210/jc.2008-1476.
47. Lo J, Min You S, Canavan B, Liebau J, Beltrani G, Koutkia P, Hemphill L, Lee H, Grinspoon G. Low-Dose Physiological Growth Hormone in Patients With HIV and Abdominal Fat Accumulation: A Randomized Controlled Trial. *J Am Med Assoc*. 2009;300(5):509–519. doi:10.1001/jama.300.5.509.Low-Dose.

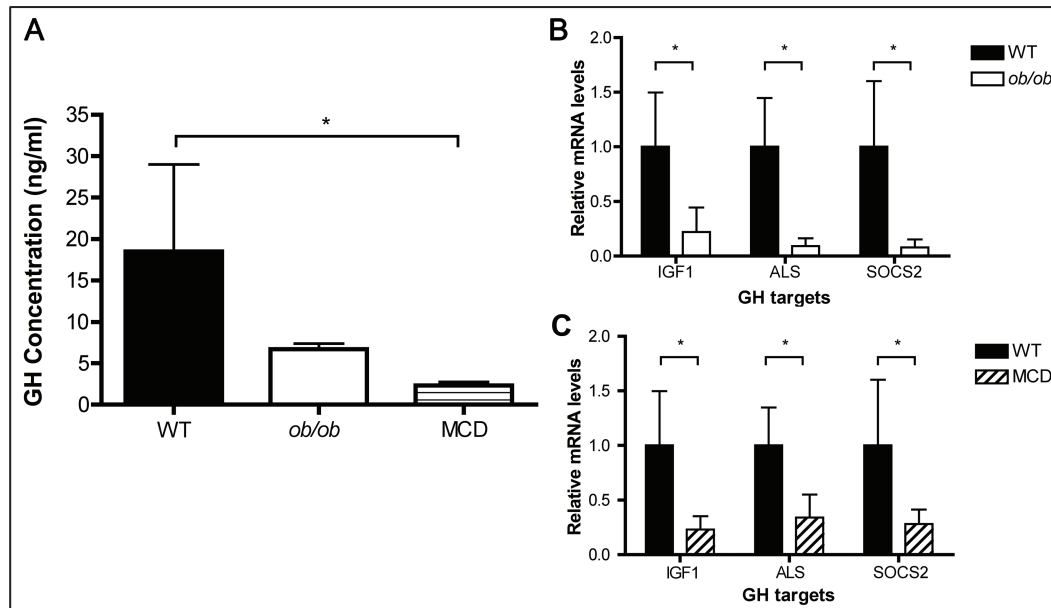


Figure 1

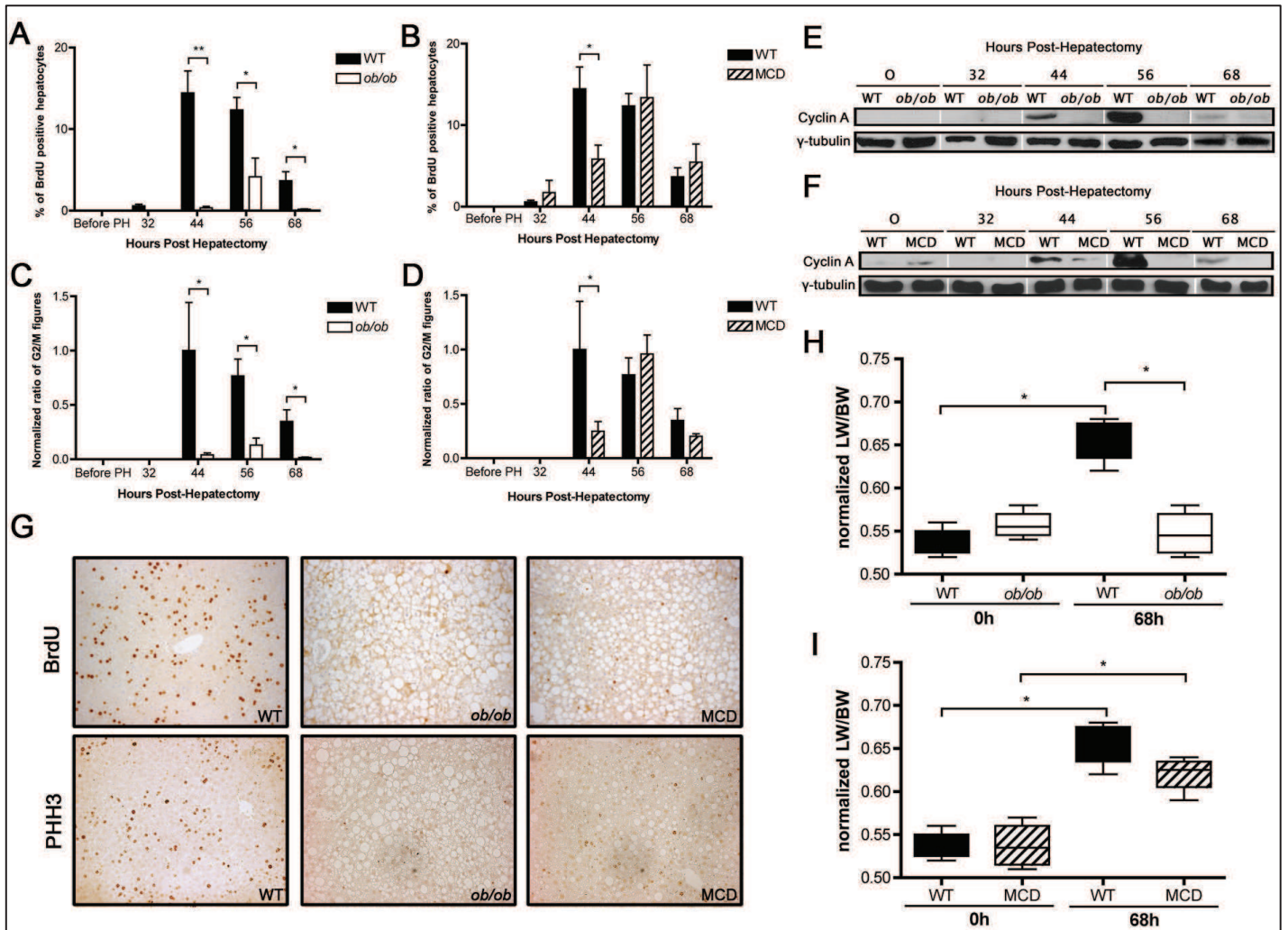


Figure 2

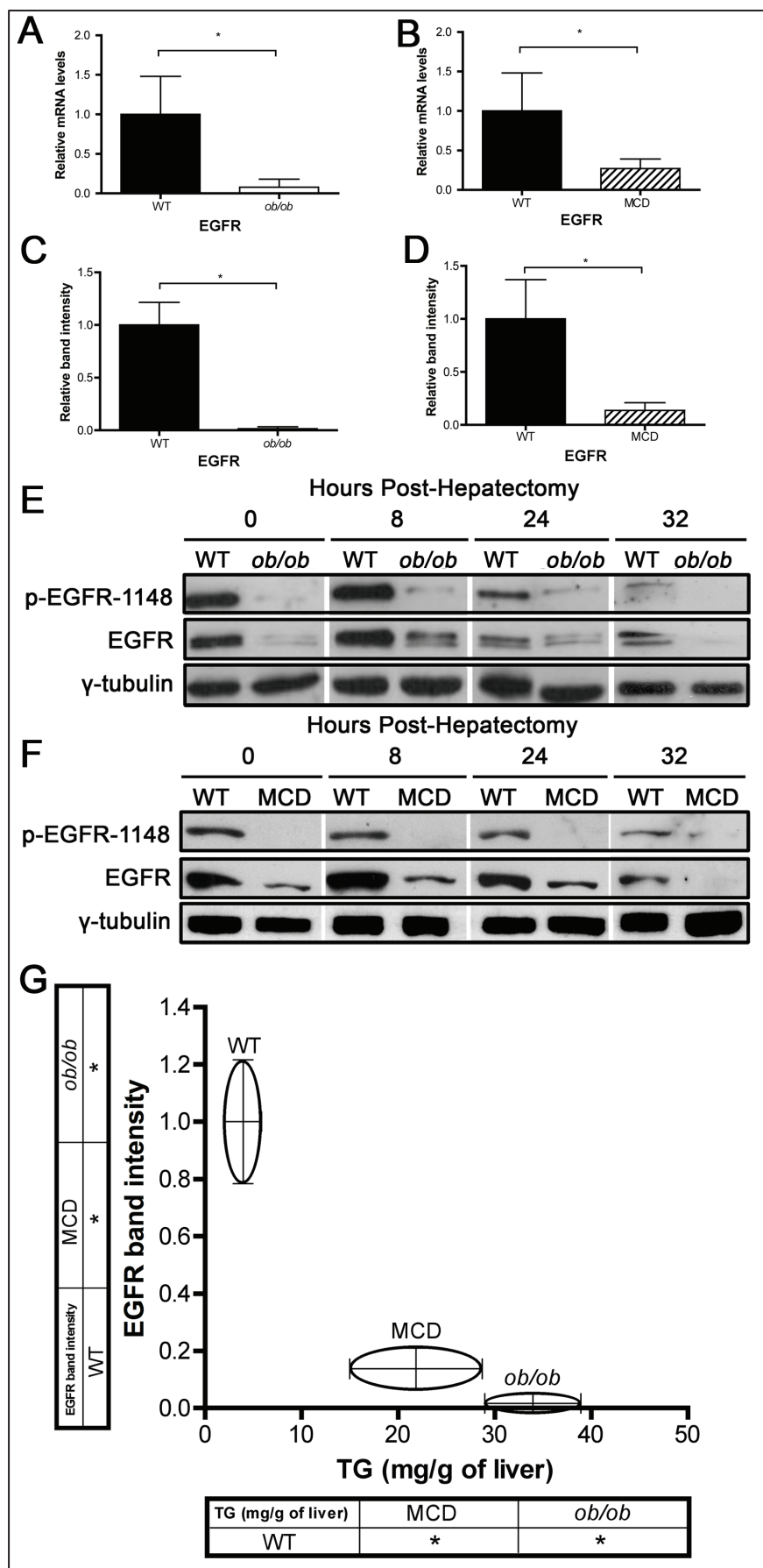


Figure 3

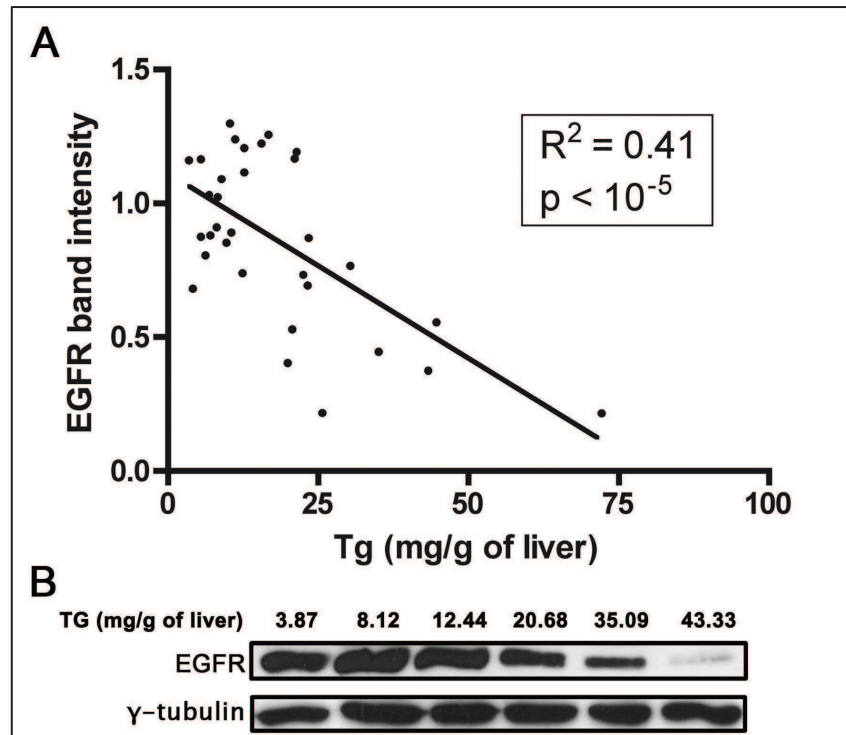


Figure 4

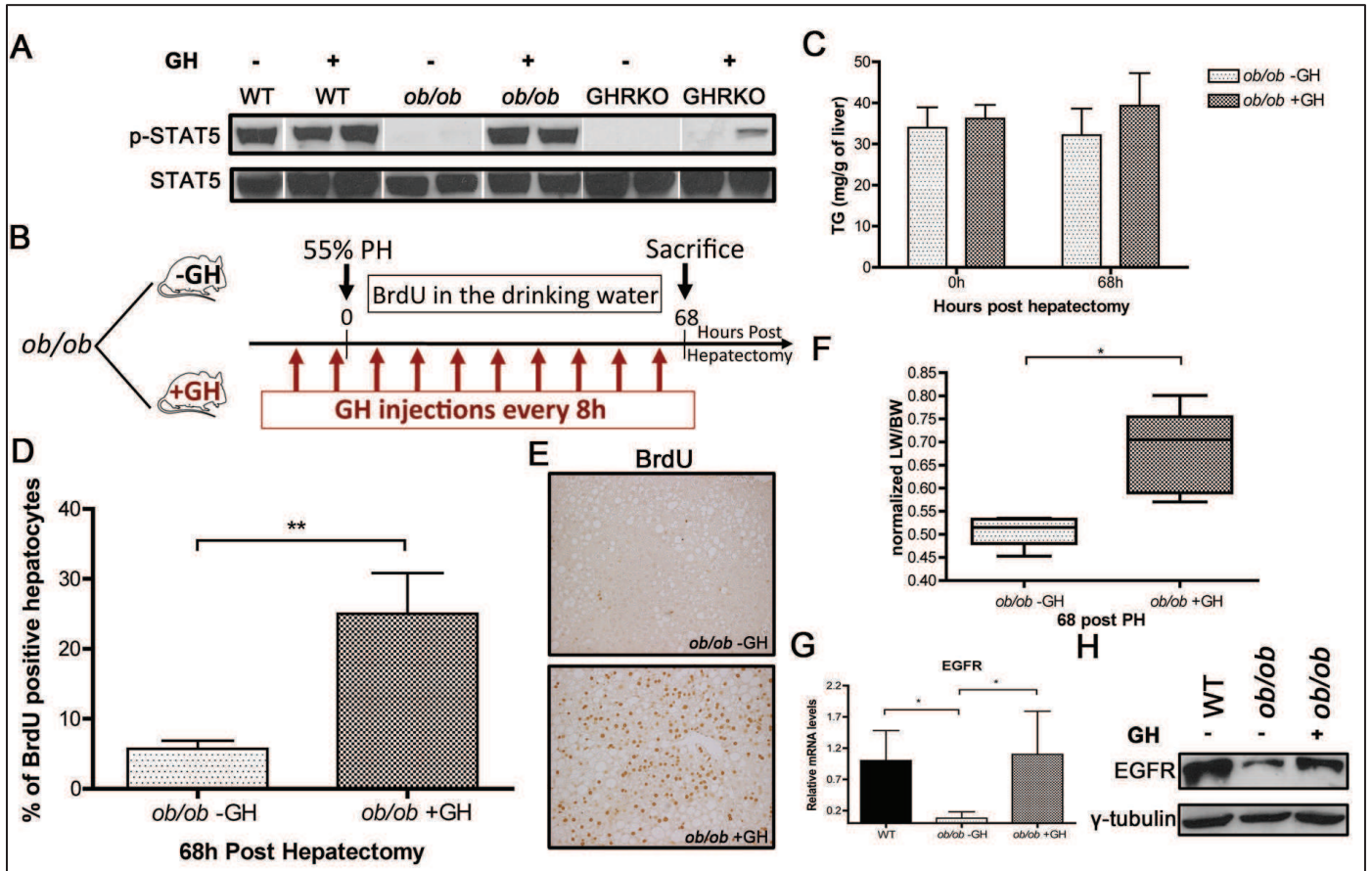


Figure 5

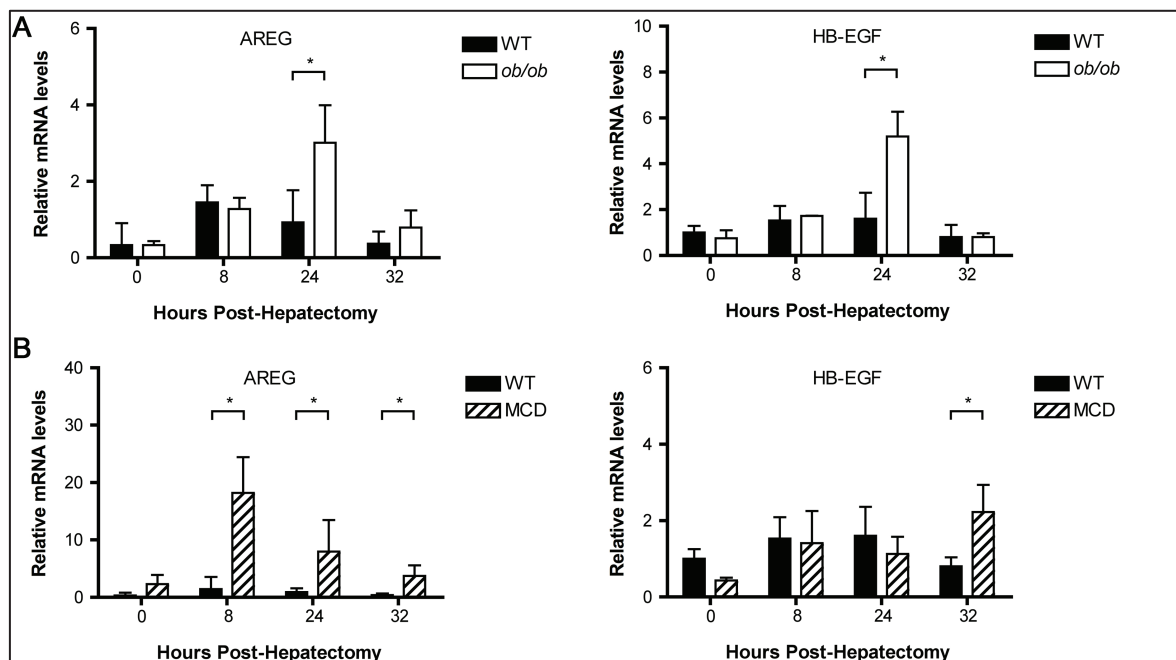


Figure Supplémentaire 1

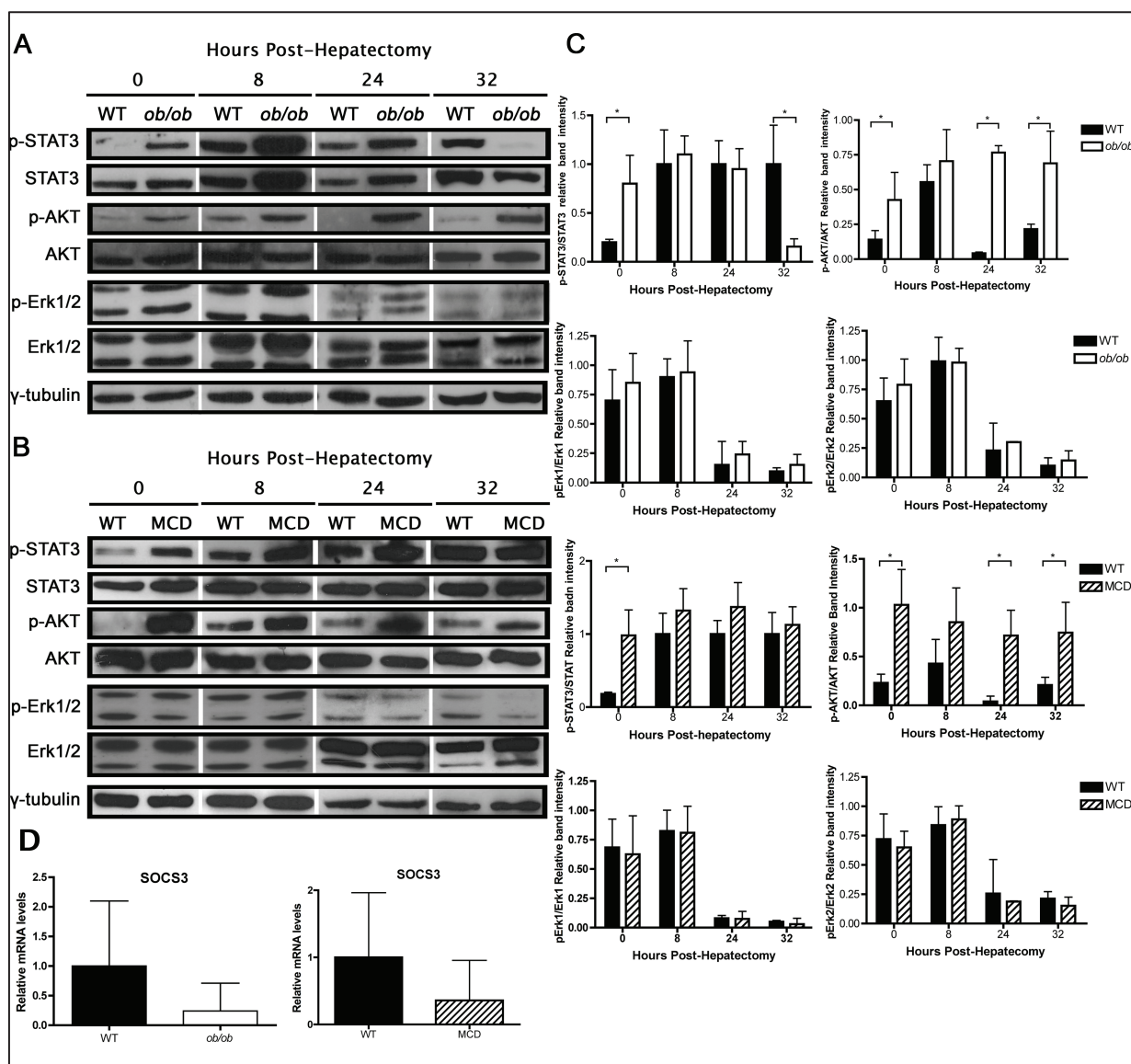


Figure Supplémentaire 2

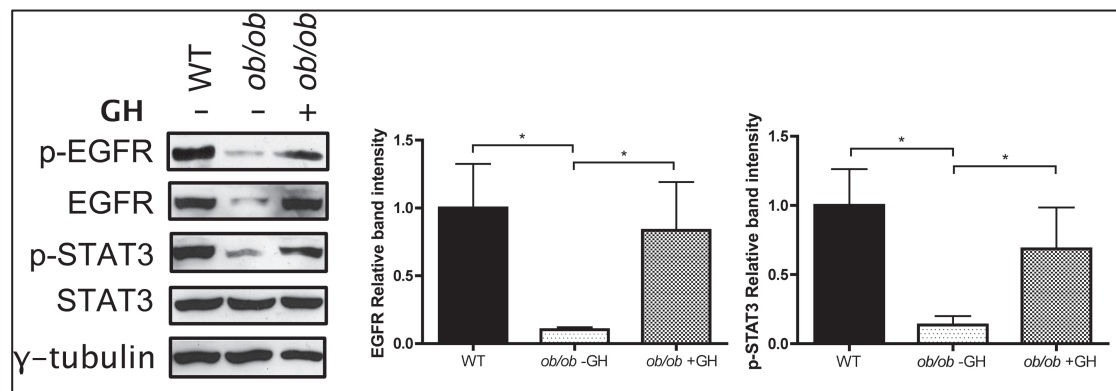


Figure Supplémentaire 3

7.4 Résultats

En analysant les transcrits cibles de l'hormone de croissance dans le foie sur nos deux modèles de souris, nous avons confirmé la corrélation existant entre obésité, stéatose et hormone de croissance. Nous avons connecté cette diminution de la voie de l'hormone de croissance à une baisse d'expression de l'EGFR en transcrit et en protéine sur ces mêmes modèles. Par ailleurs, pour la première fois, nous montrons une corrélation entre le niveau de stéatose hépatique et la diminution de l'expression de l'EGFR sur des biopsies de patients obèses, suggérant que ce défaut est également retrouvé chez l'homme de façon quantitative. Après hépatectomie partielle, les souris *ob/ob* montrent une inhibition drastique de l'entrée en phase S des hépatocytes qui n'est pas restaurée au cours du temps. En revanche, les souris MCD présentent un défaut de régénération qui se manifeste par un retard de 12h d'entrée en phase S. Ces résultats sont liés à une inhibition quasi totale de l'expression de la protéine EGFR dans les heures suivant l'hépatectomie partielle. L'analyse des voies en aval de l'EGFR n'a pas permis de mettre en évidence une modification drastique d'une des voies majeures de signalisation de l'EGFR. Les protéines AKT et STAT3 sont hyperinduites sur nos deux modèles, en comparaison avec les animaux non stéatosiques, dans les premières heures suivant l'hépatectomie. Cependant, cette induction ne permet pas d'expliquer le défaut de régénération observé. D'autre part, Erk1/2 ne présente pas de dérégulation au cours de la cinétique de régénération, contrairement à ce que nous avons observé dans le modèle GHrKO. A 32h, on a cependant observé une absence de la phosphorylation de STAT3 chez les souris *ob/ob*, ce qui pourrait avoir un rôle dans le défaut de régénération observé. Par ailleurs, l'injection répétée d'hormone de croissance sur les souris *ob/ob* a permis de restaurer le niveau protéique d'EGFR et d'activation de STAT3 à 32h ainsi que de partiellement corriger la prolifération hépatocytaire post hépatectomie comparée aux souris non injectées. Ce dernier résultat ouvre la porte à des perspectives thérapeutiques potentielles sur l'Homme.

7.5 Résultats supplémentaires

7.5.1 La diminution de l'EGFR associée à la stéatose hépatique : un mécanisme général inhibant la prolifération hépatique ?

L'expression de l'EGFR sur des modèles HFD

Au début de notre projet, nous avons initialement ciblé davantage de modèles murins de stéatose hépatique. En effet, en plus des modèles ob/ob et MCD, nous souhaitons également faire cette étude sur des modèles de régimes gras (HFD pour *High Fat Diet*). Ce type de modèle présente l'avantage de se rapprocher de nos régimes occidentaux dits « régimes *Fast Food* ». Cependant, il n'existe pas un mais de nombreux modèles de régimes HFD. En effet, le pourcentage ainsi que la composition des protéines, glucides et lipides varient énormément d'un régime à l'autre. Puisque le fructose (en provenance du sucrose) a été décrit comme un élément majeur dans l'initiation de la stéatose hépatique [94], nous avons opté pour deux régimes différents variant essentiellement dans leur composition en glucides. Le premier dit « HFD1 » (88137, Harlan Teklad Premier Laboratory Diets, Madison, WI) présentait 43% kcal de glucide et en particulier, 34% de sucrose au poids. Le deuxième (D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ) proposait 35% kcal de glucide, dont 20% de sucrose au poids. Des souris sauvages ont donc été placées sous ces deux régimes pendant 12 à 16 semaines dans le but de valider la diminution d'expression de l'axe GH/EGFR sur un plus grand nombre de modèles murins.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 7.1B, C, nous avons observé que la baisse de l'expression protéique de l'EGFR dépendait du type ou de la durée du régime. Néanmoins, au sein d'un même modèle de régime gras, nous avons observé que les animaux répondaient différemment au régime, ce qui provoquait des différences phénotypiques en terme de contenu en triglycérides hépatiques au sein d'un même groupe. Nous avons obtenu de meilleurs résultats, quoi que difficilement exploitables, avec le régime HFD1, qui présentait également une diminution manifeste de l'expression des cibles de l'hormone de croissance (Figure 7.1A). D'autre part, les niveaux de triglycérides de ces animaux, quel que soit le régime utilisé, restaient bien inférieurs à ceux des modèles ob/ob et MCD. Ces données soulignent l'existence éventuelle d'un seuil de stéatose en deçà duquel l'expression d'EGFR ne semble pas altérée. A la vue de ces résultats préliminaires, l'utilisation de régimes gras (HFD) sur des périodes plus longues ou de compositions différentes aurait éventuel-

lement conduit à un phénotype de stéatose et de diminution d'EGFR plus marqués.

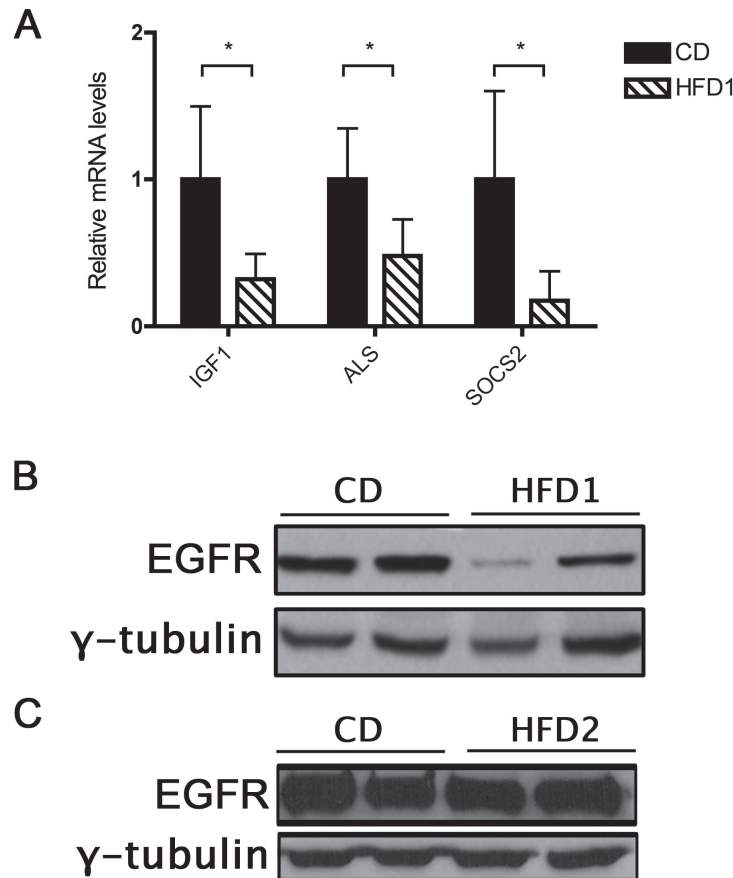


FIGURE 7.1 – Analyse de l'expression d'EGFR sur deux modèles de régime gras. A) Expression relative des transcrits ARN des cibles de l'hormone de croissance IGF-1, ALS et SOCS2 sur un régime gras (HFD1) par qRT-PCR ($n > 3$ /genotype). Chaque point a été réalisé en duplicat. B), C). Western blot de l'expression d'EGFR sur des modèles de régimes gras (HFD1 et 2). La γ -tubuline sert de témoin de charge.

L'inhibition de l'EGFR empêche la régénération hépatique induite par injection de CCL4

Nous nous sommes demandés si l'implication de l'EGFR dans le défaut de régénération hépatique pouvait être dépendant du modèle de régénération étudié. En effet, les études sur les défauts de régénération hépatique en cas

de stéatose utilisent pour la plupart le modèle de l'hépatectomie partielle. Cependant, d'autres utilisent des modèles de régénération par injection de toxine. Ainsi, il a été montré que les souris *ob/ob* ne régénèrent ni après hépatectomie partielle, ni après injection de CCL4. Cependant, dans un cas l'administration de leptine corrige le défaut de régénération [177] et pas dans l'autre [181]. Pour autant, on connaît très peu de choses des mécanismes contrôlant la régénération après CCL4. De plus, de précédents travaux au laboratoire montrait une activation de l'EGFR au cours de la régénération hépatique induite après injection de CCL4. Ainsi, pour savoir si l'EGFR était impliqué dans la régénération hépatique induite par un toxique, nous avons étudié l'expression d'EGFR après administration de CCL4 en présence ou en absence d'un inhibiteur d'EGFR.

Bien que la prolifération induite par CCL4 soit moins synchrone que celle induite par hépatectomie partielle, nous avons préalablement établi que le pic de régénération chez les animaux sauvages se trouvait à 48h après injection de CCL4. Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier ce timing en particulier pour cette expérience. Nous avons donc injecté en intra-péritonéal 3,5mL/kg de CCL4 dilué dans un volume 1 :10 d'huile minérale, à des souris sauvages. Deux jours avant l'injection de CCL4 et jusqu'au moment du sacrifice (à 48h post-injection), nous avons injecté les souris toutes les 12h, soit avec l'Erlotinib (ChemieTek, Indianapolis, IN), un inhibiteur de l'EGFR solubilisé à 10mg/mL dans une solution aqueuse à 6%w/v de Captisol, soit avec son transporteur le Captisol.

Le résultat de cette expérience montre une diminution de plus d'un facteur 10 de la prolifération hépatocytaire 48h post injection chez les souris inhibées pour l'EGFR par rapport aux contrôles (Figure 7.2). Ces données montrent le rôle prépondérant de l'EGFR sur le contrôle de la prolifération après injection de CCL4. Il aurait été intéressant d'étudier d'autres temps de la cinétique afin d'observer si nous reproduisions une inhibition majeure de la prolifération ou juste un retard de l'entrée en cycle des hépatocytes injectées avec l'Erlotinib. Cependant, par association, nous pouvons penser que l'absence d'EGFR chez les souris *ob/ob* participe également au défaut de régénération observé après injection de CCL4. Ce résultat souligne le rôle essentiel de ce récepteur dans le contrôle de la prolifération hépatocytaire de façon générale et pas uniquement après hépatectomie partielle.

Ces deux séries d'expériences nous ont permis de souligner deux points importants de ce projet. Premièrement, les résultats sur les modèles HFD tendent à montrer une diminution du signal EGFR sur d'autres modèles que *ob/ob* et MCD. Deuxièmement, la régénération hépatique après CCL4 semble aussi contrôlée par ce récepteur. Ainsi, même si d'autres expériences sont nécessaires pour valider ces résultats, nous pouvons suggérer que la diminution

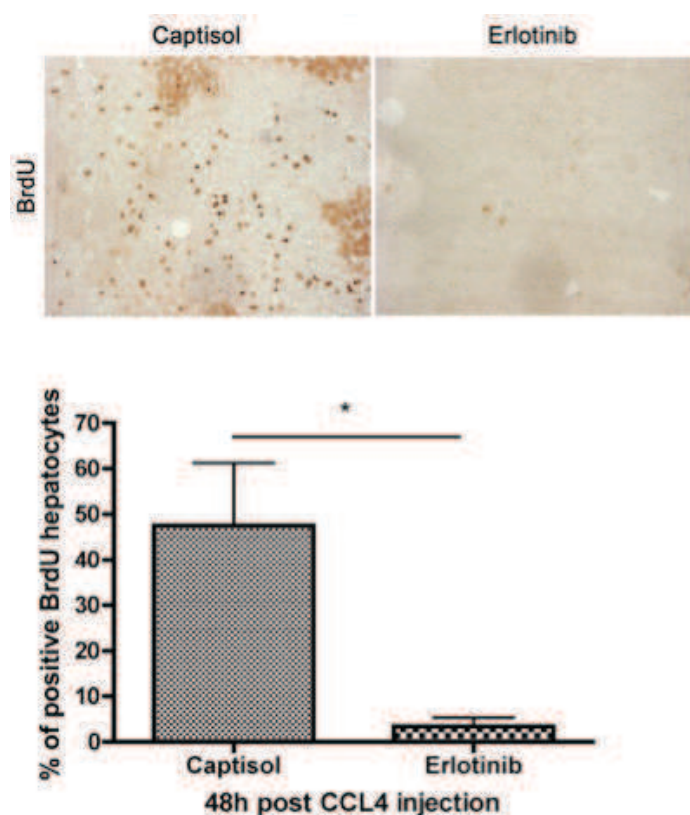


FIGURE 7.2 – La prolifération hépatocytaire mesurée par BrdU 48h après injection de CCL4. Immunohistochimie et quantification de la prolifération hépatocytaire mesurée 2h après injection de BrdU chez les animaux injectés en CCL4 48h avant, en présence d'un inhibiteur d'EGFR (Erlotinib) ou non (Captisol) ($n \geq 4$ /génotype).

de l'EGFR associée à la stéatose hépatique est un mécanisme général inhibant la prolifération hépatique dans plusieurs modèles de régénération du foie.

7.5.2 Aller plus loin dans le sauvetage phénotypique en validant le rôle de l'EGFR

Plusieurs expériences de sauvetages phénotypiques nous auraient permis de valider de façon plus définitive le rôle de l'EGFR. En effet, nous souhaitions initialement injecter de l'Erlotinib sur nos souris également injectées avec de l'hormone de croissance, afin de nous assurer que le sauvetage phénotypique ne fonctionnait pas dans ces conditions. Ceci nous aurait permis de valider l'importance de l'axe hormone de croissance/EGFR dans le sauve-

tage phénotypique que nous observons. Cependant, les premières expériences que nous avons menées sur des souris contrôles injectées à l'Erlotinib et hépatectomisées se sont révélées létales. Cette mortalité, non observée chez nos souris injectées en CCL4, s'explique éventuellement par la plus grande importance de la signalisation EGFR post hépatectomie par rapport au CCL4. En effet, l'Erlotinib inhibe peut être l'activation d'EGFR dans un autre type cellulaire primordial pour la survie après hépatectomie partielle, mais pas après injection de CCL4. Une autre explication consiste à penser que le modèle d'hépatectomie est plus drastique que le modèle de CCL4. En effet, il s'agit d'une procédure délicate qui mène à un taux de mortalité sur les souris sauvages sensiblement plus élevé qu'après l'injection de CCL4. L'hépatectomie partielle est en conséquence davantage susceptible de mener à une létalité post opération, en particulier si un autre facteur y est ajouté. L'utilisation de doses moins fortes de cet inhibiteur permettrait éventuellement d'outrepasser la létalité observée, bien que ceci puisse induire une inhibition seulement partielle du signal EGFR.

En parallèle de cette expérience, nous souhaitons restaurer des cibles plus en aval de l'hormone de croissance, notamment STAT5 mais surtout l'EGFR directement, dans le but d'observer une augmentation de la prolifération hépatocytaire. Pour ce faire, nous avons opté pour une approche de sauvetage phénotypique par vecteur adénoviral. Ces derniers ont une efficacité d'infection des cellules non-mitotiques bien supérieure à celle des vecteurs lentiviraux et tout particulièrement les hépatocytes (jusqu'à 80 à 90% d'efficacité) lorsqu'ils sont injectés en intraveineux chez la souris, mais présentent le défaut de provoquer une forte réaction inflammatoire. Néanmoins, les hépatocytes ne cyclant qu'une à deux fois après l'hépatectomie, nous n'avons pas à choisir un vecteur intégratif comme les vecteurs lentiviraux pour lesquels il est nécessaire d'obtenir de très hauts titres, afin d'obtenir une transduction hépatocytaire partielle. L'alternative aurait été l'utilisation de vecteurs de Virus Adéno-Associé (AAV pour Adeno-Associated Virus), qui selon les sérotypes sont capables de transduire efficacement les hépatocytes *in vivo*. Cependant nous n'avons pu faire ce choix car la taille de l'ADNc de l'EGFR (supérieur à 3kb) dépassait les capacités d'insertion de fragment ADN dans ce type de vecteur. Pour ces différentes raisons, nous avons construit un vecteur adénoviral exprimant l'EGFR, avons obtenu un vecteur adénoviral exprimant une forme transdominante positive de STAT5b inducible par un AdrTTA (reverse tetracycline-transactivator), ainsi que leurs contrôles respectifs AdGFP, et AdGFP inducible par un AdrTTA. Nous avons en effet souhaité tester l'effet de la restauration de STAT5 dans le foie des souris ob/ob sur la prolifération hépatocytaire après hépatectomie partielle car nous pensons que STAT5 est un acteur en aval de l'hormone de croissance respon-

sable de l'induction d'EGFR. Le protocole de construction et d'amplification des différents vecteurs adénoviraux est développé en annexe.

Nous avons dans un premier temps vérifié que le vecteur adénoviral pour EGFR induisait l'activation d'EGFR sur des hépatocytes in vitro (Figure 7.3A). Le pic de réaction immunitaire est décrit entre 24 et 72h après injection d'adénovirus. Nous avons donc testé plusieurs temps de sacrifice après l'injection d'adénovirus in vivo chez la souris *ob/ob* pour garantir un taux de transduction supérieur à 65% (Figure 7.3B) avec un minimum de réponse inflammatoire. Ceci nous a amené à pratiquer nos hépatectomies six jours après l'injection. Au moment de l'opération et jusqu'au sacrifice à 68h après hépatectomie, nous avons placé du BrdU dans l'eau de boisson des souris pour voir l'effet de ce sauvetage phénotypique de façon cumulative (Figure 7.3C).

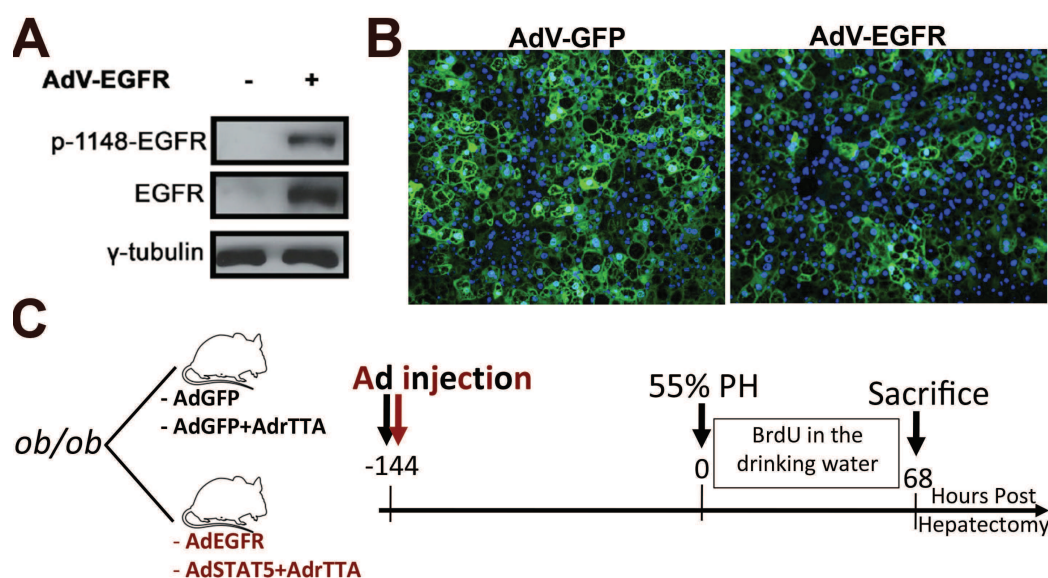


FIGURE 7.3 – Optimisation du protocole de sauvetage phénotypique par injection d'un vecteur adénoviral. (A) Western blot de l'expression et de l'activation d'EGFR par l'AdV-EGFR sur des hépatocytes in vitro. La γ -tubuline sert de témoin de charge. (B) Transduction 6 jours après injection d'AdV-GFP (79,7%) et d'AdV-EGFR (67,9%) (C) Protocole de sauvetage phénotypique par injection de vecteurs adénoviraux

En réalisant ces expériences, nous avons observé une mortalité majorée en injectant notre vecteur adénoviral AdV-EGFR après hépatectomie partielle (12/14 soit >85% de mortalité), contrairement à l'injection du vecteur AdV-GFP, ne nous permettant pas de mener cette étude à terme. Nous expliquons cette mortalité par une différence de toxicité des productions virales entraînant potentiellement une réaction immunitaire trop importante

avec l'AdV-EGFR chez des animaux connus pour être très sensibles à l'hépatectomie. Nous ne pouvons pas non plus exclure totalement l'hypothèse peu vraisemblable selon laquelle la surexpression massive d'EGFR soit létale chez ces animaux dans le contexte inflammatoire d'un adénovirus. Pour tester cette hypothèse nous pourrions utiliser une plus faible quantité d'adénovirus ou produire un nouveau stock contenant une proportion plus faible de particules non infectieuses. Par ailleurs, parmi les deux souris *ob/ob* ayant été injectées avec l'AdV-EGFR et ayant survécu, nous n'avons pas observé de restauration de la prolifération hépatocytaire post hépatectomie. Ces souris étaient très faibles et peu actives et il est possible qu'elles aient été vouées à mourir quelques heures plus tard. Néanmoins, bien que leur nombre soit trop faible pour conclure, ces résultats peuvent encore une fois s'expliquer par une réaction inflammatoire trop forte, venant s'ajouter à l'inflammation hépatique déjà présente chez les *ob/ob*, ce qui pourrait bloquer la prolifération hépatocytaire post hépatectomie.

Nous avons tenté de nous affranchir de ce problème de mortalité en adaptant notre protocole avec des hépatectomies moins drastiques d'un tiers seulement. Dans ce cas, nous n'avons pas observé de mortalité après hépatectomie partielle suite à l'injection adénovirale. Néanmoins, nous n'avons pas pour autant observé de restauration de la prolifération hépatocytaire chez les animaux injectés par l'AdEGFR comparés aux contrôles. Les deux séries d'animaux présentaient une prolifération à un niveau semblable peu élevé. L'hépatectomie d'1/3 n'induit qu'une faible prolifération hépatocytaire caractérisée (quelques pourcents seulement) par une absence de pic d'incorporation de BrdU post hépatectomie, reflétant ainsi une prolifération non synchronisée des hépatocytes dans laquelle EGFR joue un rôle prépondérant. D'autre part, il a été montré que cette prolifération a lieu en absence d'activation de la voie EGFR par certains de ces ligands comme l'HB-EGF, pourtant indispensable à la régénération du foie après hépatectomie des 2/3 [220]. Il est donc possible que l'absence de restauration de la prolifération par surexpression d'EGFR chez la souris *ob/ob* soit expliquée par ce mécanisme.

Quant à l'injection de l'AdV-STAT5 et AdV-rTTA sur souris *ob/ob*, nous avons rencontré un autre problème qui n'a pas permis la réalisation de ce sauvetage phénotypique. L'injection du contrôle par combinaison de l'AdV-GFP et du AdV-rTTA induit une réexpression de l'EGFR post hépatectomie chez les souris *ob/ob*. De façon intéressante, on note une corrélation entre le niveau de prolifération sur nos souris *ob/ob* injectées avec les adénos AdV-GFP+AdVrTTA et la réexpression de l'EGFR. Les souris ne proliférant pas ou très peu ne montrent pas d'expression de la protéine EGFR, tandis que les souris proliférant davantage révèlent une expression ainsi qu'une phosphorylation plus accrue d'EGFR (Figure 7.4) en corrélation avec la diminution

de la stéatose hépatique. Ces résultats suggèrent en premier lieu l'existence d'un effet graduel, ou éventuellement seuil de l'EGFR sur la prolifération hépatocytaire post hépatectomie. On peut également émettre l'hypothèse que l'AdrTTA est impliqué dans le phénotype de diminution de la stéatose hépatique. En effet, une étude a déjà montré un lien entre expression de rTTA et stéatose hépatique, bien que celle-ci soit en corrélation inverse avec notre étude [333]. Dans cette dernière étude, les auteurs utilisaient une lignée transgénique exprimant rTTA dans le tissu adipeux et observaient une stéatose hépatique. Pour expliquer ces résultats, on peut supposer que l'expression de rTTA dans le tissu adipeux induit la lipolyse des acides gras présents, provoquant un arrivage massif de ceux-ci dans le foie pour y être stockés. De même, dans notre cas, l'AdrTTA exprimé massivement dans le foie pourrait également déclencher des signaux de lipolyse hépatique, diminuant ainsi le profil stéatosique de nos animaux. Pour répondre à ces questions, il serait intéressant d'injecter l'AdrTTA seul afin de montrer si nous observons le même phénotype sur nos animaux *ob/ob*.

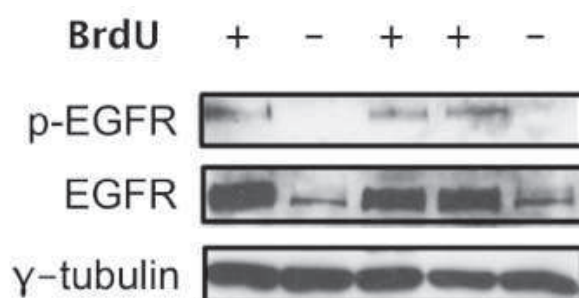


FIGURE 7.4 – Réexpression de l'EGFR et de la prolifération par injection d'AdGFP+AdrTTA. Western blot pour EGFR sur des souris *ob/ob* injectées avec AdGFP+AdrTTA et sacrifiées à 68h post PH. La γ -tubuline sert de témoin de charge.

Nous souhaitons également utiliser ces vecteurs adénoviraux pour valider l'implication de la voie EGFR en aval de la voie de l'hormone de croissance dans le défaut de régénération observé. Pour cela, nous aurions utilisé le modèle GHrKO pour tenter de restaurer la prolifération hépatocytaire après hépatectomie par injection du vecteur adénoviral AdEGFR. Idéalement, il serait également intéressant de pouvoir effectuer le même type d'expériences avec des animaux déficients en STAT5 auxquels on injecterait le vecteur adénoviral AdEGFR. Ces séries d'expériences permettraient de bien valider le rôle de la voie GH/EGFR dans le sauvetage phénotypique observé. Elles sont malheureusement difficiles à mettre en place en raison des limites induites

par cette technologie adénovirale.

7.5.3 L'implication d'autres voies de signalisation pour expliquer le défaut de régénération chez les souris *ob/ob*

Bien que la dérégulation de l'axe GH/EGFR soit partagée entre plusieurs modèles de stéatose hépatique et explique le défaut de régénération observé, nous montrons néanmoins des différences phénotypiques entre *ob/ob* et MCD. En effet, l'inhibition de la prolifération chez les souris *ob/ob* est beaucoup plus drastique que chez les MCD qui présentent plutôt un retard de régénération qu'une diminution. De plus, le sauvetage phénotypique par injection d'hormone de croissance chez les souris *ob/ob* n'est que partiel, laissant entrevoir l'implication d'autres voies de signalisation pour expliquer le défaut de régénération chez ces animaux. Nous avons donc tenté de mettre en évidence la dérégulation d'autres voies de signalisation, en parallèle ou non de l'EGFR.

La voie PLC- γ est inhibée post hépatectomie chez les souris *ob/ob*

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'implication de PLC- γ par le biais de l'analyse de la voie de signalisation EGFR. En effet, on décrit habituellement trois voies de signalisation en aval de l'EGFR post hépatectomie partielle : AKT, Erk1/2 et STAT3. Cependant, il existe une quatrième voie activée par l'EGFR qui n'est que rarement étudiée dans le cadre de la régénération hépatique. Il s'agit de PLC- γ , qui appartient à une famille d'enzymes hydrolysant les esters des phospholipides. Classiquement, les PLCs catalysent le PIP2 membranaire en Diacylglycérol (DAG) et IP₃ en utilisant le calcium comme cofacteur et permettent ainsi l'activation d'un certain nombre de cibles associé notamment dans la prolifération. En analysant l'expression et l'activation de cette protéine, nous avons observé une absence du transcrit ainsi que de la protéine à 32h post hépatectomie chez les souris *ob/ob* (Figure 7.5).

Ce résultat pose deux questions en particulier. La première est de comprendre quel acteur moléculaire est à l'origine de la baisse d'expression de cette protéine. En effet, l'EGFR est décrit comme un activateur au niveau protéique par modification post-traductionnelle et non comme induisant la transcription de PLC- γ , il apparaît donc plus probable que cette inhibition soit due à une autre voie de signalisation. La seconde consiste à savoir si la diminution d'expression de cette protéine influe sur le phénotype de régénération hépatique observée chez les souris *ob/ob*. Nous ne connaissons que

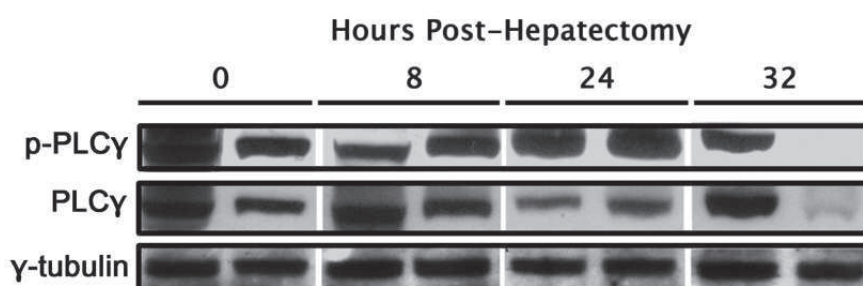


FIGURE 7.5 – Western Blot de l’expression de la phosphorylation de PLC- γ . Analyse par western blot de l’expression et de la phosphorylation de PLC- γ au cours de la régénération hépatique chez les *ob/ob* comparés aux contrôles. La γ -tubuline était utilisée en témoin de charge.

peu d’éléments sur PLC- γ et la prolifération hépatocytaire. Deux articles avaient souligné son implication dans un modèle de consommation chronique d’alcool [334][335] et une autre publication avait mis en évidence une augmentation de PLC- γ au cours de la régénération hépatique [336]. Il est à ce stade difficile de comprendre si la baisse de PLC- γ joue un rôle dans le défaut de régénération hépatique observée chez les souris *ob/ob*, des expériences d’inhibition de PLC- γ *in vivo* au cours de l’hépatectomie partielle permettraient de pouvoir répondre à ces questions plus finement. Cependant, son implication dans ce phénotype reste toutefois concevable.

La voie du TGF- β est suractivée chez les *ob/ob* post hépatectomie

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la voie du TGF- β . En effet, il avait été montré chez les souris *ob/ob*, une augmentation de la phosphorylation de STAT3 en association à une augmentation de l’expression de p21 après hépatectomie partielle. Puisque nous observons une augmentation de STAT3 chez nos souris *ob/ob* et MCD dans les premières heures suivant l’hépatectomie partielle, nous avons cherché à savoir si ceci était corrélé à une augmentation de p21 comme précédemment décrit [179]. Nous avons observé dans nos modèles une augmentation de l’expression de p21 chez les souris *ob/ob* mais pas chez les souris MCD (Figure 7.6A, B). Nous avons également montré une augmentation de plus de 20 fois de l’expression de p15 chez les souris *ob/ob* à 32h, mais pas chez les souris MCD (Figure 7.6A, B).

Ces résultats nous ont donc amenés à regarder des voies de signalisation alternatives à STAT3 chez les souris *ob/ob* qui pourraient être responsables de la surexpression de p15 et p21, nous conduisant ainsi à étudier la voie

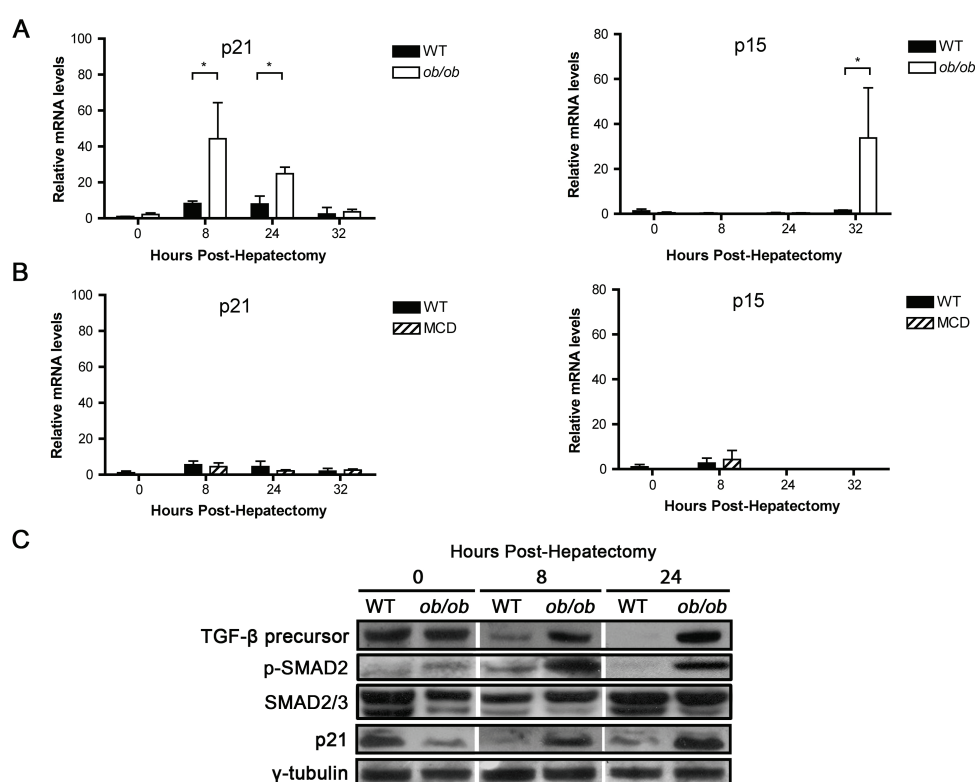


FIGURE 7.6 – Analyse de la voie TGF- β au cours de la régénération hépatique chez les animaux stéatosiques comparés aux contrôles. A. B Expression relative des transcrits ARN de p15 et p21 au cours de la régénération hépatique chez les *ob/ob* et MCD comparés aux contrôles par qRT-PCR ($n > 4$ /genotype). Chaque point a été réalisé en duplicat. C. Analyse par western blot du précurseur TGF- β , p-SMAD2 et p21 au cours de la régénération hépatique chez les *ob/ob* comparés aux contrôles. La γ -tubuline était utilisée en témoin de charge.

du TGF- β . Celle-ci se trouve en amont des protéines inhibitrices des kinases cycline-dépendantes p15 et p21. Nous n'avons pas noté de différence significative pour l'expression des transcrits du TGF- β 1, 2 et 3 entre les souris *ob/ob* et les contrôles (Figure 7.7). Cependant, le précurseur protéique du TGF- β a été trouvé surexprimé pendant les 32 premières heures de la régénération hépatique chez les souris *ob/ob*, en comparaison aux contrôles, ce qui suggère une stabilité protéique accrue du TGF- β précurseur sur ces souris. De plus, une augmentation de la phosphorylation de Smad2 a été observée entre 8 et 24h après l'hépatectomie partielle (Figure 7.6C). L'ensemble de ces données suggère que la voie de signalisation du TGF- β est suractivée dans les premières étapes de la régénération hépatique après hépatectomie partielle chez

les souris *ob/ob*, ce qui participe probablement au défaut de régénération observé chez ces animaux.

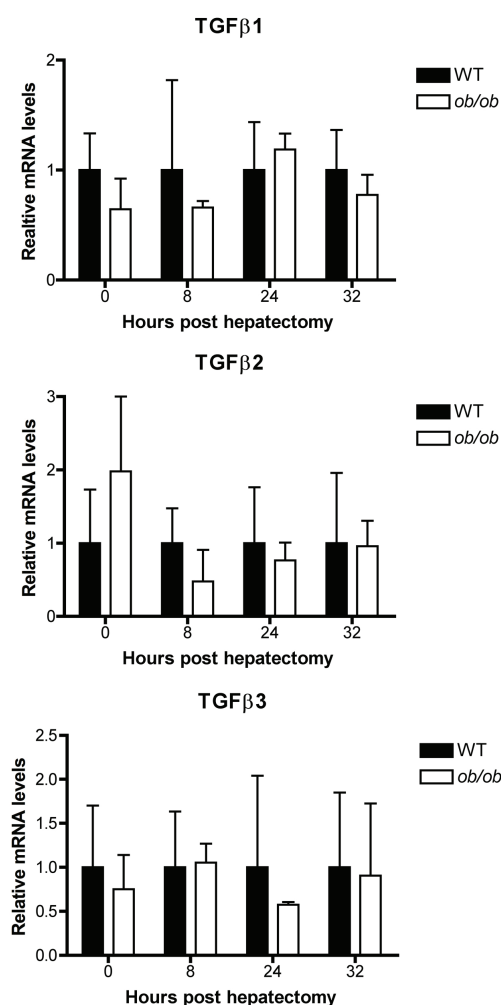


FIGURE 7.7 – Analyse des transcrits du TGF- β . Expression relative des transcrits ARN du TGF β 1 à 3 au cours de la régénération hépatique comparés aux contrôles par qRT-PCR ($n \geq 3$ /genotype). Chaque point a été réalisé en duplicat.

Ces résultats mériteraient d'être approfondis, mais permettent en tout cas d'expliquer pourquoi les MCD présentent un défaut de régénération moins drastique que les souris *ob/ob*, ainsi que la raison pour laquelle la restauration des *ob/ob* avec injections d'hormone de croissance n'est que partielle.

Troisième partie

**DISCUSSION ET
PERSPECTIVES**

Chapitre 8

Discussion des résultats

8.1 Les études précédentes sur la régénération du foie en cas de stéatose hépatique divergent

Ces dernières années, de nombreux de travaux se sont concentrés autour de la régénération du foie dans le cadre de la stéatose hépatique. Cependant, il est aujourd’hui encore très difficile de dégager une interprétation globale de ces études, ce qui rend leur analyse relativement difficile. Deux constats en particulier permettent d’appréhender ces problèmes. Premièrement, les résultats de ces études sont loin d’être unanimes quant à l’impact de la stéatose sur la régénération du foie et deuxièmement, les voies de signalisation impliquées lorsque les auteurs observent un défaut de régénération sont très différentes.

Plusieurs explications peuvent être données pour répondre à ces différences. En effet, les défauts de régénération du foie semblent être connectés au degré de stéatose du modèle utilisé. Même si on définit cette maladie à partir de la présence de gouttelettes lipidiques dans au moins 5% des hépatocytes, les modèles décrivant un défaut de régénération hépatique présentent une stéatose généralement plus marquée [174][179]. C’est pourquoi le modèle génétique utilisé, ou encore le temps de régime appliqué, sont autant de variables importantes à prendre en compte pour ce genre d’études. D’autre part, concernant les modèles ne présentant pas une inhibition drastique de la régénération, mais davantage un retard comme celui observé dans le modèle MCD, il est important d’effectuer une étude détaillée de la cinétique de régénération, au risque de mal interpréter le phénotype. Ceci peut représenter une explication concernant les résultats contradictoires observés sur

la capacité du modèle MCD à régénérer [185][186][187], mais également sur d'autres. En effet, en fonction des temps de cinétique étudiés, on peut arriver à la conclusion que ce modèle de stéatose régénère [175], ou pas [174]. La recherche sur le sujet gagnerait certainement à utiliser des modèles de stéatose plus homogènes, ainsi qu'à étudier précisément les cinétiques de régénération de ces différents modèles.

La deuxième discordance de ce type d'études concerne les différentes voies de signalisation incriminées. En effet, beaucoup de ces recherches soulignent l'importance de la dérégulation des voies inflammatoires dans les phénotypes observés. Cependant, celles-ci varient en fonction des papiers, des modèles utilisés et même au sein d'un même modèle [178][179][180]. Bien que cette variété de résultats altère la compréhension globale des voies moléculaires inhibant la régénération hépatique dans le cadre de la stéatose, elle a l'avantage de nous présenter un aperçu de la complexité du mécanisme. En effet, il est raisonnable de penser qu'une pathologie affectant à la fois le métabolisme, l'histologie et les fonctions du foie vont altérer de multiples voies de signalisation en conséquence. En revanche, les résultats de notre étude sont les premiers à permettre de proposer un mécanisme commun à plusieurs modèles de stéatose hépatique (peut-être même davantage) et confortés par de premiers résultats sur l'Homme. Nous proposons ainsi qu'une dérégulation de la voie GH/EGFR dans le cadre de la stéatose hépatique participe à l'inhibition de la régénération du foie après hépatectomie partielle.

8.2 La dérégulation de l'axe GH/EGFR est un mécanisme général responsable du défaut de régénération du foie lié à la stéatose hépatique

Il existe en effet une corrélation relativement bien décrite entre stéatose, obésité et hormone de croissance. Bien que l'on n'en comprenne pas le lien, plusieurs explications ont été avancées pour justifier la diminution du taux de l'hormone de croissance avec l'obésité. On a tout d'abord proposé qu'une augmentation de l'IGF-1 sérique chez les patients obèses pouvait jouer une boucle de rétrocontrôle négative sur la sécrétion d'hormone de croissance [337]. On a également pensé que la présence d'acides gras libres dans le sang ou encore l'hyperinsulinémie des personnes en surpoids pouvait jouer sur les sécrétions d'hormone de croissance [338]. On a aussi expliqué qu'une baisse des réserves hypophysaires d'hormone de croissance chez les obèses pouvait

en être responsable. Mais ceci a rapidement été contredit par l'injection de GHRH chez des patients obèses. Ces derniers sécrétaient alors de l'hormone de croissance à un taux normal [339]. Ainsi, nous n'expliquons toujours pas le mécanisme à l'origine de cette dérégulation, mais les résultats de notre étude semblent indiquer que la corrélation ne s'effectue pas entre l'hormone de croissance et l'obésité, mais davantage entre l'hormone de croissance et la stéatose. En effet, dans le modèle MCD qui ne présente pas d'obésité, nous observons également une diminution de l'activation des cibles de l'hormone de croissance. D'autre part, notre étude sur patients révèle une corrélation entre la diminution de l'EGFR et la stéatose, et non avec l'obésité. Ces différentes données amènent à penser que la diminution de l'axe hormone de croissance/EGFR est liée à la stéatose hépatique. Ce phénomène serait peut être contrôlé soit directement au niveau du foie, soit par des facteurs circulants liés à la stéatose hépatique. Par ailleurs, puisque l'absence du signal de l'hormone de croissance dans le foie est également connue pour induire une obésité et une stéatose [321], la diminution des sécrétions de l'hormone de croissance dans un contexte de stéatose agit certainement comme un cercle vicieux, amplifiant le phénotype à plus long terme.

Puisque l'hormone de croissance contrôle la transcription de l'EGFR, on observe que la diminution de cette dernière dans le cadre de la stéatose hépatique, induit une chute de l'expression de l'EGFR. Par ailleurs, la diminution d'expression et d'activation de ce récepteur n'est pas restaurée dans les heures suivant la régénération hépatique, au moment où les hépatocytes en ont besoin pour effectuer leur progression en G1 et assurer leur transition G1/S. On sait en effet que l'inhibition de la voie EGFR par invalidation génique spécifiquement dans le foie [340] ou *shRNA* [341] induit un défaut drastique de régénération après hépatectomie partielle. Ce même défaut a été observé sur des souris délétées pour le récepteur de l'hormone de croissance (GHRKO) qui présentaient également une absence du récepteur EGFR [342], ainsi que sur des souris STAT5 KO [84], pour lesquelles le niveau transcriptionnel d'EGFR est également fortement diminué. Ces observations valident d'autant plus l'implication de l'axe hormone de croissance/EGFR dans la régénération hépatique post hépatectomie. On peut par ailleurs penser que le contrôle de la voie de l'hormone de croissance sur l'EGFR s'effectue via STAT5b comme nous en avons discuté précédemment.

Il est aussi intéressant de noter que l'EGFR semble être impliqué dans le contrôle de la régénération hépatique au delà du mécanisme de l'hépatectomie partielle. En effet, il avait déjà été montré que la voie de signalisation EGFR était importante pour la prolifération des hépatocytes *in vitro*. De plus, nos résultats non publiés indiquent que l'EGFR est également impliqué dans le contrôle de la régénération hépatique déclenchée par injection de

CCL4. Puisque les souris *ob/ob* ne régénèrent pas non plus après injection de CCL4 [177], on peut envisager que l'inhibition de l'EGFR est également responsable de l'absence de régénération dans ce cadre. Pour cela, il faudrait vérifier que l'injection de CCL4 ne fait pas varier les taux d'hormone de croissance ou encore que cela n'induit pas la ré-expression de l'EGFR. Néanmoins, ces données illustrent l'importance de ce récepteur, potentiellement dans le contrôle de plusieurs processus de prolifération hépatocytaire. Ceci souligne ainsi les conséquences que pourrait avoir la dérégulation de l'axe hormone de croissance/EGFR dans le cadre de la stéatose, sur différents mécanismes de régénération hépatique, au delà même de l'hépatectomie partielle.

8.3 Il existe une bonne corrélation entre diminution de l'EGFR et augmentation de la stéatose chez l'Homme

Une publication avait déjà mis en évidence la corrélation étroite entre diminution de la sécrétion de l'hormone de croissance et l'obésité [325]. Nos résultats ont permis de dégager une bonne corrélation entre l'augmentation de la stéatose et la diminution de l'expression protéique d'EGFR. Puisque la plupart de nos patients présentaient un surpoids, nous les avons discriminé non pas en fonction de leur obésité, mais en fonction du degré de stéatose à la fois histologique et par dosage de triglycérides. Nous avons observé une forte corrélation entre la voie GH/EGFR et la stéatose.

D'autre part, il est connu que l'hormone de croissance est régulée différemment selon les sexes [343], ce qui entraîne un dimorphisme d'expression de certaines de ses cibles dans le foie. Pour cette raison, nous aurions pu imaginer dégager un effet sexe sur l'expression de la protéine EGFR, en fonction de la stéatose. Nous n'avons cependant pas réussi à isoler un tel effet sur nos données, ce qui s'explique soit par l'absence d'effet sexe sur l'expression de l'EGFR dépendante de l'hormone de croissance, soit par le nombre trop restreint de biopsies pour ce type d'analyse. Il est cependant à noter que lors de l'étude sur les souris GHrKO, nous n'avons pas noté de différence d'expression de l'EGFR au niveau transcriptionnel en fonction du sexe chez les souris sauvages et que l'inhibition de l'EGFR chez les souris GHrKO était totale chez les deux sexes.

En première approximation, pour simplifier l'interprétation du résultat et reprendre une méthodologie couramment utilisée, nous avons choisi d'illustrer la corrélation entre la stéatose hépatique et la diminution de l'EGFR protéique par un modèle linéaire. Cependant, le modèle de décroissance ex-

ponentielle s'approche davantage de nos résultats avec un gain de coefficient de corrélation de l'ordre de 25%, s'approchant ainsi de $R^2=0,6$. Ceci semble cohérent avec la notion de seuil biologique au delà duquel l'EGFR diminue drastiquement avec la stéatose hépatique. Pour cette raison, la présence d'une stéatose modérée n'amène pas forcément une diminution notable de l'expression de la protéine EGFR, tandis qu'une stéatose plus marquée aura des conséquences sur son expression. Cet effet seuil est également en accord avec les résultats non publiés que nous avons obtenu sur des *ob/ob* d'âges différents (6, 10 et 13 semaines), qui révélaient une diminution sensible de l'EGFR entre 6 et 10 semaines, mais qui n'était totale qu'à 13 semaines de vie. Par extension, ce résultat pourrait également expliquer en partie pourquoi certains modèles murins de stéatose ne présentent pas d'inhibition majeure de l'EGFR, ou encore pourquoi d'autres n'ont pas de défaut de régénération post hépatectomie. Naturellement, il serait intéressant d'augmenter le nombre de patients, en particulier présentant une forte stéatose hépatique. Ceci nous permettrait d'affiner notre modèle de régression entre l'augmentation de la stéatose hépatique et la diminution de l'EGFR protéique. D'autre part, il serait également intéressant de pouvoir récupérer le sérum de ces patients et corrélér à la fois EGFR, stéatose hépatique mais également les niveaux sériques de l'hormone de croissance.

8.4 L'identification des voies en aval de l'EGFR reste incertaine

Même si l'importance de la voie de signalisation EGFR dans le cadre de la régénération hépatique est aujourd'hui admise dans la littérature, nous en connaissons très peu des voies en aval sous son contrôle. Les premières études s'intéressant à inhiber les différents ligands de la voie EGFR ne décrivaient pas de mécanistique [216][217]. Quant aux articles inhibant le récepteur lui-même, aucun ne trouvait de diminution de l'activation des voies en aval communément décrites AKT, STATs et ERK1/2. Ils suggéraient l'implication d'autres voies sous le contrôle de l'EGFR pour expliquer le défaut de régénération hépatique observé. Le premier trouvait une inhibition de l'activation en particulier de $\text{Nf-}\kappa\text{-B}$ et de p38 [340] et le second une baisse transcriptionnelle de la voie STAT3 [341]. Nos résultats n'ont pas réussi à reproduire dans les modèles de stéatose que nous avons étudié, ce qui avait déjà été publié dans la littérature. Ainsi, l'absence de dérégulation de ces voies de signalisation ne restaure pas le phénotype de prolifération hépatocytaire. D'autre part, des auteurs avaient déjà montré que l'inhibition de $\text{Nf-}\kappa\text{-B}$ n'avait pas

d'effet sur la régénération hépatique [344]. Nous suggérons donc que les voies précédemment décrites ne sont pas responsables du défaut de régénération hépatique en absence d'EGFR ou qu'il existe une autre voie de signalisation touchée, que nous n'avons pas mise en évidence.

D'autre part, nos précédents travaux utilisant un modèle muté pour le récepteur de l'hormone de croissance (GHRKO) révélaient un défaut de régénération lié à une inhibition de l'expression de l'EGFR ainsi que de l'activation d'Erk1/2. Cependant, notre étude sur les modèles *ob/ob* et MCD décrit une inhibition de la voie de l'hormone de croissance et de l'EGFR, sans pour autant retrouver l'absence d'activation d'Erk1/2. Cette dérégulation n'est pas non plus décrite dans les modèles d'inhibition d'EGFR par *knock out* et shRNA après hépatectomie. Ces différents résultats remettent en question l'hypothèse selon laquelle l'EGFR entraîne un défaut de régénération hépatique par l'intermédiaire d'Erk1/2. Cependant, chez les souris GHRKO, l'inhibition d'Erk1/2 peut également participer au défaut de régénération observé, indépendamment du signal EGFR. En effet, Erk1/2 est décrit comme pouvant être aussi activé directement en aval de l'hormone de croissance. Il est possible que nos modèles murins de stéatose présentent une baisse de signal de l'hormone de croissance suffisante pour supprimer l'expression de l'EGFR, mais non pour inhiber l'activation de la voie Erk1/2, indépendante de l'EGFR.

Parmi les voies en aval de l'EGFR étudiées, nous observons une suractivation de la voie AKT dans nos deux modèles *ob/ob* et MCD après l'hépatectomie partielle. Il est assez difficile de lier la suractivation de la voie AKT à la diminution d'expression de l'EGFR et habituellement, l'activation d'AKT participe à la régénération hépatique après hépatectomie partielle. Ces deux éléments soulignent que la suractivation d'AKT n'est pas responsable du défaut de régénération observé chez nos modèles murins de stéatose. Cette activation pourrait correspondre à la nécessité d'augmenter la taille des hépatocytes qui stockent les lipides puisque la voie AKT régule ce processus.

Finalement, la seule voie de signalisation potentiellement dérégulée et pouvant avoir une incidence, que nous proposons en aval de l'EGFR est la voie STAT3. On observe tout d'abord une sur-activation de la voie STAT3 pendant les premières heures suivant la régénération hépatique à la fois chez les souris *ob/ob* et chez les souris MCD. Encore une fois, il est difficile d'imputer la suractivation de cette voie à l'inhibition d'EGFR. D'autre, part, l'augmentation de l'activation de STAT3 est tantôt décrite comme inhibant la régénération hépatique, tantôt comme l'augmentant. L'inhibition de la prolifération hépatocytaire associée à la suractivation de STAT3 est liée à une augmentation de la protéine SOCS3, dont la fonction est antiproliférative [345], ce qui n'est pas le cas dans notre modèle. Ceci nous a amené à

8.4. IDENTIFICATION INCERTAINE DES VOIES EN AVAL D'EGFR167

exclure l'implication de cette voie pour expliquer le phénotype de défaut de régénération. En effet, la suractivation de STAT3 est certainement indépendante de l'hépatectomie partielle, mais plutôt liée à l'augmentation de la voie inflammatoire IL-6, comme cela a été décrit chez les souris *ob/ob* [346], en particulier sur les MCD [347], qui présentent une forte inflammation.

A l'inverse, on observe dans un second temps une chute de l'activation de STAT3 à 32h post hépatectomie chez les souris *ob/ob*, mais pas chez les MCD. Nous suggérons ainsi que la diminution de l'activation de STAT3 à 32h pourrait être responsable, au moins en partie, du phénotype observé chez les souris *ob/ob*. Il est en effet intéressant de constater que les souris GHRKO révélaient également une augmentation de la phosphorylation de STAT3 post hépatectomie pour chuter à 32h [342]. Or, s'il est admis que IL-6 et TnF- α sont responsables de son activation durant les premières heures de la régénération du foie, son activation plus tardive a été décrite mais pas élucidée. En effet, l'inhibition de STAT3 a déjà été liée à un défaut de régénération hépatique au moment du priming des hépatocytes [348][349]. Puisque les expériences d'injections d'EGF chez la souris montrent une activation de STAT3 dans le foie [350], il est tentant d'attribuer l'incapacité des souris *ob/ob* à activer STAT3 à 32h après hépatectomie à l'absence de signalisation EGFR. Cette hypothèse est d'ailleurs confortée par la restauration de la phosphorylation de STAT3 à 32h post hépatectomie chez les souris *ob/ob* injectées avec de l'hormone de croissance lorsque celles-ci présentent une prolifération restaurée ainsi qu'un niveau d'EGFR normal. En revanche, le niveau d'inflammation plus important dans le modèle de stéatohépatite MCD, pourrait être responsable de la suractivation de STAT3 à tous les temps de la régénération, prévenant ainsi la baisse d'activation que nous observons chez les souris *ob/ob*. L'activation de STAT3 à 32h n'a cependant jamais été démontrée comme dépendante de l'EGFR. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de regarder l'effet de l'injection d'erlotinib (à condition de trouver une concentration non létale) sur STAT3 à 32h après hépatectomie sur des souris sauvages.

D'autre part, il existe des cibles bien plus en aval de ces trois voies de signalisation. En effet, en utilisant un modèle d'injections d'hormone de croissance après hépatectomie partielle chez des souris âgées, il a été montré que la restauration de la prolifération s'effectuait via l'expression de Foxm1b, qui est un facteur de transcription essentiel pour l'entrée en mitose des hépatocytes au cours de la régénération hépatique [309]. De façon intéressante, une autre étude a montré qu'il existait une diminution de l'expression d'EGFR chez les animaux âgés [351]. Ainsi, puisqu'il est connu que Foxm1b contrôle les transitions G1/S et G2/M [116], cette protéine pourrait représenter une cible bien plus en aval de l'axe hormone de croissance/EGFR dans le cadre

du défaut de régénération associé à la stéatose hépatique. D'autre part, la transcription de *Foxm1b* au cours de la régénération hépatique commence tardivement (32h post hépatectomie), ce qui pourrait être cohérent avec la chute d'activation de STAT3 à 32h. Il est également à noter qu'une étude récente sur la lignée cellulaire K562 a montré que *Foxm1* est une cible transcriptionnelle de STAT3, impliqué dans la prolifération [352]. Enfin, les souris GHRKO montrent une diminution d'expression de *Foxm1b* 32h après hépatectomie. Lorsque l'on force l'expression de *Foxm1b* dans ces souris en les croisant avec une lignée surexprimant cette protéine dans le foie, on restaure un pic de prolifération équivalent à celui observé chez les souris sauvages.

8.5 Le défaut de régénération hépatique est partiellement restauré par l'injection d'hormone de croissance

Nous avons confirmé l'implication de l'axe Hormone de croissance/EGFR dans le défaut de régénération hépatique en conduisant des expériences de sauvetages phénotypiques par injections périodiques d'hormone de croissance sur les souris *ob/ob* avant et après l'hépatectomie partielle. Ceci nous a permis d'obtenir une augmentation de la prolifération hépatocytaire post hépatectomie d'un facteur 6 par rapport aux *ob/ob* non injectées. Cette restauration s'accompagne d'un retour du niveau d'EGFR protéique normal ainsi que d'une augmentation de la phosphorylation de STAT5, ce qui nous a permis d'appuyer encore une fois l'hypothèse selon laquelle la restauration de l'EGFR s'effectue sous le contrôle de STAT5. Il est également intéressant de noter que nous avons observé une restauration de l'EGFR et de l'activation de STAT3 à 32h après l'hépatectomie partielle, validant davantage l'implication de cette voie dans le phénotype observé chez les souris *ob/ob*.

Cette expérience de sauvetage phénotypique montre pour la première fois un retour de la prolifération hépatique après hépatectomie partielle dans un modèle de stéatose drastique. Ces résultats soulignent qu'il n'y a pas, du moins dans ce modèle, de désensibilisation du signal de l'hormone de croissance, ce qui permet d'envisager une approche thérapeutique. Il serait intéressant de tester ce sauvetage phénotypique sur d'autres modèles, notamment ceux qui développent une inflammation importante et qui présentent une inhibition drastique de la régénération hépatique (le modèle fructose par exemple). D'autre part, cette expérience montre également que la prolifération des hépatocytes n'est pas altérée de façon définitive en cas de stéatose

hépatique, mais que ceux-ci peuvent entrer à nouveau dans le cycle cellulaire. Ceci représente une information très intéressante à l'égard des applications médicales utilisant les propriétés régénératives du foie.

En revanche, cette expérience de restauration par injections d'hormone de croissance montre un effet partiel lorsqu'on compare le niveau de prolifération des souris injectées avec de l'hormone de croissance à celui des contrôles sauvages, soulignant l'implication d'autres voies de signalisation dans l'inhibition de la régénération hépatique chez les souris *ob/ob*. Ainsi, il serait intéressant d'étudier notamment l'effet du traitement à l'hormone de croissance sur la voie TGF- β chez les *ob/ob*.

Le protocole que nous avons utilisé pour le sauvetage phénotypique par l'hormone de croissance impliquait de fortes doses injectées. Nous pourrions également mettre au point un protocole d'injection à doses plus faibles, ce qui pourrait nous prémunir d'une éventuelle activation trop forte des rétrocontrôles négatifs de l'hormone de croissance comme SOCS2. En effet, il est possible que l'injection d'hormone de croissance à fortes doses permette une restauration complète de l'EGFR, mais empêche la réactivation d'autres cibles, du fait de l'activation de ces rétrocontrôles, expliquant ainsi la restauration seulement partielle de ce sauvetage.

8.6 Il demeure quelques différences entre le modèle *ob/ob* et MCD

Du fait des différences entre nos deux modèles, mais aussi de la restauration seulement partielle observée avec notre sauvetage phénotypique, nous avons été amené à étudier d'autres voies de signalisation chez la souris *ob/ob*, participant éventuellement au défaut de régénération chez ce modèle.

Premièrement, nous avons noté la diminution de la voie PLC- γ sur les souris *ob/ob* à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau protéique à 32h post hépatectomie. PLC- γ est une voie de signalisation décrite en aval de l'EGFR mais jamais étudiée dans le cadre de la régénération hépatique. Son importance dans la régénération hépatique a déjà été soulignée dans un modèle de défaut de prolifération hépatocytaire induit par une apport chronique d'alcool [334][335]. On avait par ailleurs noté son augmentation au cours de la régénération hépatique [336]. Il est donc envisageable que le déficit en PLC- γ soit impliqué dans le défaut de régénération observé qu'il soit ou non la conséquence de l'absence d'activation de la voie EGFR. Cependant, l'absence de démonstration sur le sujet amène à proposer l'implication de cette voie avec la plus grande prudence. De la même façon, il serait intéres-

sant de regarder l'effet de l'injection d'erlotinib sur l'expression de PLC- γ à 32h post hépatectomie sur des souris sauvages. D'autre part, nous pourrions également utiliser un inhibiteur de PLC (U-73122 ou L-108) pour observer les conséquences de l'inactivation de cette protéine sur la prolifération post-hépatectomie. Ces deux inhibiteurs pharmacologiques ne sont pas spécifiques de la forme γ , mais seules deux des six isoformes de PLC (β et γ), sont trouvées en concentration importante dans le foie [336]. Ces expériences nous permettraient d'apporter un éclairage quant au rôle de PLC- γ au cours de la régénération hépatique.

Deuxièmement, nous avons mis en exergue la dérégulation d'une autre voie de signalisation, TGF- β au cours de cette étude. En effet, il avait auparavant été décrit une surexpression de p21 ainsi que de p27, présentées comme étant sous le contrôle d'une augmentation de la phosphorylation de STAT3 dans ce modèle [179]. Nos résultats ont permis de confirmer la surexpression de p21, associée à celle de p15, un autre inhibiteur du cycle cellulaire connu de la voie TGF- β . En analysant d'autres membres de la voie TGF- β en amont, connus pour activer ces deux cibles, nous avons noté une augmentation de la phosphorylation de SMAD2 ainsi qu'une surexpression du précurseur TGF- β . L'augmentation des cibles inhibitrices du cycle cellulaire p15 et p21 n'a en revanche pas été retrouvée sur le modèle MCD, ce qui nous a amenés à exclure l'hypothèse de l'implication de cette voie dans ce modèle. En revanche, ces données nous ont permis de reconsidérer l'augmentation de ces inhibiteurs du cycle cellulaire comme des cibles de la voie TGF- β plutôt que de STAT3. Pour appuyer cette hypothèse, nous rappelons que l'augmentation de STAT3 n'est pas accompagnée d'une surexpression de SOCS3 chez les souris *ob/ob*. Cependant, on observe habituellement que l'inhibition de la prolifération hépatique associée à une augmentation de STAT3 fait intervenir une induction de SOCS3. De plus, si la surexpression de p15 et p21 était sous le contrôle de l'augmentation de STAT3, nous aurions du retrouver les mêmes résultats chez les souris MCD, présentant également une augmentation de la phosphorylation de STAT3.

De façon schématique, on peut décrire les deux voies de signalisation EGFR et TGF- β comme participant à une balance finement régulée au cours de la régénération hépatique. En effet, l'une stimule la prolifération et est activée après l'hépatectomie partielle, l'autre inhibe la prolifération et n'est activée que plusieurs heures post hépatectomie (Figure 8.1).

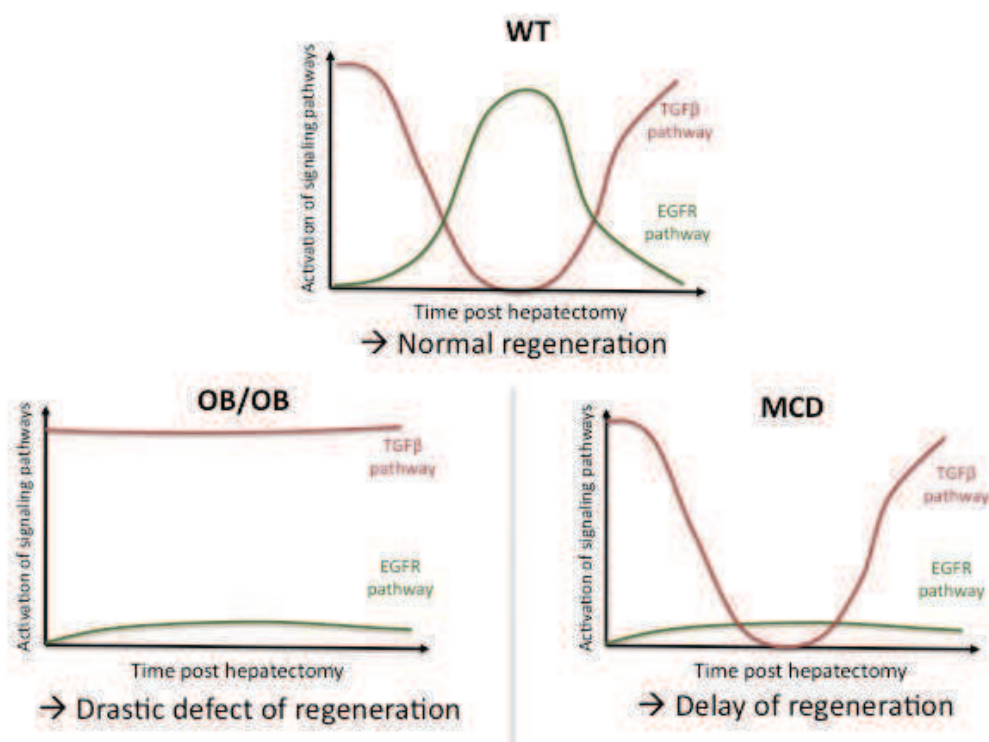


FIGURE 8.1 – Modèle proposé des voies EGFR et TGF- β au cours de la régénération hépatique.

Chapitre 9

Des perspectives de travail

9.1 Quelques pistes pour aller un peu plus loin

Bien que nous ayons obtenu une restauration de la prolifération hépatocytaire en injectant de l'hormone de croissance, nous avons été confronté à des problèmes techniques en testant nos vecteurs adénoviraux, nous empêchant d'apporter la preuve directe que l'expression de l'EGFR suffit à restaurer le phénotype et que celle-ci passe par l'activation de STAT5. Ainsi, l'utilisation de vecteurs adénoviraux n'est certainement pas la meilleure approche dans le cadre de la régénération hépatique. De plus, le contexte de l'hépatectomie partielle implique différents types cellulaires et cytokines circulantes, qui empêchent l'utilisation de modèles *in vitro*. Afin de contourner ce problème, nous pourrions utiliser un autre outil pour mettre en place notre sauvetage phénotypique : créer une lignée transgénique pour l'EGFR ou celui-ci se trouverait sous la dépendance d'un promoteur continuellement exprimé dans le foie adulte comme celui de la transthyrétine -exprimé en abondance dans le foie des souris *ob/ob* [353]- et d'étudier la restauration de la prolifération hépatique post-hépatectomie des souris *ob/ob* par croisement avec cette lignée. A terme, ces expériences de sauvetage phénotypique nous permettraient de véritablement incriminer la responsabilité de la voie de signalisation EGFR dans le défaut de régénération du foie, observé dans le cadre de la stéatose hépatique. Par ailleurs, nous pourrions ainsi regarder l'effet de cette restauration sur la voie STAT3 en particulier.

A l'inverse, nous pourrions poursuivre nos expériences de restauration de la prolifération par injections d'hormone de croissance sur des souris *ob/ob*, en couplant ces dernières à une inhibition de l'EGFR par l'erlotinib. La position plus en aval de l'EGFR permettrait ainsi de bloquer le sauvetage normalement induit par l'hormone de croissance, à la fois sur la prolifération

hépatocytaire et sur les voies de signalisation éventuellement restaurées. Cependant, les doses d'erlotinib que nous avons utilisées jusqu'à présent étaient létales après hépatectomie partielle. Nous pourrions éventuellement essayer d'injecter des doses sensiblement plus faibles ou à défaut, utiliser des *siRNA* ciblés contre l'EGFR. Il s'agit par ailleurs d'une technique qui permet la délivrance de *siRNA* essentiellement hépatique suite à son administration par voie systémique.

Pour finir, afin de valider le rôle de la voie TGF- β et de ses cibles p21 et p15, il faudrait tout d'abord comparer par immunoprécipitation les ratios entre les Cdk/Cyclines, versus les Cdk/Cdk_i, notamment le ratio cdk4/Cycline D1. Ensuite, il serait possible de bloquer le signal TGF- β en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la voie qui ciblent son récepteur. L'injection de SB-431542 à des souris *ob/ob* avant ou au cours de l'hépatectomie partielle, permettrait d'observer son effet sur la prolifération des hépatocytes. Par ailleurs, il serait possible de coupler les injections d'hormone de croissance à une inhibition de la voie TGF- β . Nous pourrions notamment pratiquer des injections de siRNA pour les inhibiteurs du cycle p15, p21 ou encore de SMAD2. Ces expériences permettraient éventuellement d'optimiser le taux de prolifération post hépatectomie après injections d'hormone de croissance. A plus long terme, l'utilisation d'une lignée de souris délétées pour le récepteur du TGF- β croisés avec des souris *ob/ob* permettrait également de répondre de façon plus définitive à ces questions.

9.2 Une ouverture thérapeutique

Certaines études soulignent déjà l'intérêt de thérapies basées sur l'injection d'hormone de croissance. Des effets notables ont été remarqués sur le tissu adipeux viscéral, ou sur le profil lipidique général [332]. D'autres publications montrent les bénéfices de l'injection d'hormone de croissance pendant 6 mois sur la correction de la stéatose hépatique développée par des patients présentant une déficience de l'hormone de croissance chez l'adulte [354]. Plus récemment, la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis a approuvé l'utilisation d'EGRIFTA^{MD}, qui est un analogue synthétique du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH), dans le traitement de la lipodystrophie de patients porteur du VIH [355]. Ces travaux indiquent que l'hormone de croissance injectée de façon chronique a des effets métaboliques bénéfiques sur la stéatose ou la distribution des graisses en général. Ces recherches soulignent aussi que l'hormone de croissance est aujourd'hui considérée pour son potentiel thérapeutique évident sur l'être

humain. Pour ces différentes raisons, le résultat des injections d'hormone de croissance sur les souris *ob/ob* offre une ouverture thérapeutique intéressante. De plus, les expériences d'injection d'hormone de croissance sur les souris MCD allaient également dans le même sens. Ainsi, il serait utile de conforter ces résultats sur d'autres modèles de stéatose hépatique. Si tel était le cas, nous pourrions envisager de développer des protocoles thérapeutiques d'injections aiguës d'hormone de croissance sur des patients affichant une stéatose hépatique, précédant des interventions chirurgicales, de résections de tumeurs du foie ou de greffes. Les injections aiguës permettraient de s'affranchir de potentiels effets secondaires induits par des injections chroniques, tout en amenant à une diminution sensible du taux de morbidité/mortalité trop souvent décrits dans ces situations pathologiques après opération.

9.3 De la stéatose au cancer : que se passe t-il ?

Le carcinome hépatocellulaire est le 8^{ème} cancer mondial par ordre de fréquence. On le diagnostique chez plus d'un demi million de personnes par an et son incidence croît depuis 30 ans. Le virus de l'hépatite B et C, l'alcool ou encore la stéatose hépatique représentent les principaux facteurs de risque. Dans la grande majorité des cas, ces pathologies entraînent le développement d'une cirrhose, qui concerne 90% des patients avec un hépatocarcinome [356]. En conséquence, il s'agit de tumeurs hétérogènes, issues de mutations variées de différentes voies de signalisation.

De plus en plus d'études mettent en évidence le rôle joué par l'EGFR dans la carcinogénèse hépatique. De nombreux travaux soulignent une augmentation de l'activation de la voie EGFR -par les ligands ou le récepteur lui-même- dans une proportion importante de carcinomes hépatocellulaires [357]. Il a également été démontré que des injections répétées de Gefitinib (un inhibiteur spécifique de l'EGFR) avait un effet anti-tumoral sur le développement d'hépatocarcinomes de souris injectées à la DEN [358]. En conséquence, de plus en plus de travaux cherchent à établir des thérapies ciblées contre l'EGFR pour lutter contre les carcinomes hépatocellulaires, comme il en existe pour le cancer du poumon.

D'autre part, la stéatose et l'obésité sont maintenant considérées comme des facteurs de risque de plus en plus important du carcinome hépatocellulaire [359]. Il a par ailleurs été montré récemment que le syndrome métabolique entraîne l'apparition de tumeurs sans développer de fibrose ou cirrhose hépatique au préalable [65]. Ainsi, de nombreux travaux associent le carcinome hépatocellulaire à la voie de signalisation EGFR, pendant que d'autres soulignent l'importance de la stéatose comme facteur de risque. Au premier

abord, ceci semble en contradiction avec les résultats de notre étude montrant une corrélation entre la stéatose hépatique et la diminution de l'EGFR.

A la lumière de ces éléments, il devient intéressant de comprendre ce qu'il se passe spécifiquement au cours de la carcinogénèse induite par la stéatose hépatique. Qu'en est-il du niveau d'activation de l'axe Hormone de croissance/EGFR au cours de la progression de la stéatose jusqu'au carcinome hépatocellulaire ? En effet, même s'il est maintenant admis que l'EGFR peut participer activement au développement de ces tumeurs, nous ne savons pas ce qu'il en est du statut de l'EGFR, particulièrement dans les tumeurs dérivant de foies stéatosiques. Il serait donc intéressant d'observer si ces carcinomes hépatocellulaires sont liés à une réexpression de la voie EGFR ou pas, et de savoir si cela participe à la transition d'une prolifération initialement inhibée au cours de la stéatose hépatique, vers une prolifération déverrouillée associée au carcinome hépatocellulaire.

Pour répondre à ces questions, nous pourrions en premier lieu continuer notre analyse de biopsies de patients obèses en se concentrant à présent sur les cas de cancers, notamment issus de foies stéatosiques. Il serait intéressant d'observer si la corrélation entre l'augmentation de la stéatose hépatique et la diminution de l'EGFR est toujours présente dans les foies tumoraux stéatosiques, ou si au contraire on observe une ré-expression de l'EGFR dans ce contexte, associée ou non à une activation de la voie de l'hormone de croissance en recherchant l'expression de ses cibles spécifiques dans le foie. Si tel était le cas, il faudrait approfondir ces observations par des expériences sur la souris. Nous pourrions choisir deux modèles induisant une stéatose hépatique que nous pouvons utiliser sur le long terme : le modèle *ob/ob* et un modèle induit par un régime fort en fructose, qui entraîne une forte stéato-hépatite et se rapproche d'un régime occidental [95], ainsi que des contrôles. Une série de ces animaux pourrait être injectés avec de la DEN pour induire la formation de carcinomes hépatocellulaires sur foie stéatosique. Il serait également intéressant de traiter la moitié de ces modèles animaux avec de l'erlotinib pendant l'ensemble de l'expérience, pour définir si ce traitement bloque, diminue le nombre de foyers tumoraux ou retarde la survenue de tumeurs hépatiques. Dès lors, nous pourrions regarder à différents moments l'expression de l'EGFR, ainsi que celles de ses ligands, mais aussi la voie de l'hormone de croissance, en analysant ses cibles transcriptionnelles dans les nodules tumoraux après microdissection laser. Cette même analyse au sein des tumeurs formées nous permettrait de mettre en parallèle le niveau d'EGFR à la taille des tumeurs observées, sur les foies stéatosiques, traités à l'erlotinib ou non.

Dans un second temps, notre objectif serait d'identifier les mécanismes

moléculaires qui sont responsables de la réinduction de l'EGFR. En effet, identifier des voies de signalisation contrôlant l'EGFR au cours de la carcinogénèse permettrait de mettre en évidence des facteurs de risque supplémentaires dans le développement tumoral et d'agir en amont, avant la mise en place et la progression des tumeurs. Il faudrait tout d'abord comprendre si cette réactivation est dépendante d'une signalisation de l'hormone de croissance ou d'autres voies. A titre d'exemple, de nombreux travaux ont notamment établi des liens entre l'inflammation et la voie de signalisation EGFR [360]. Il a notamment été montré que le $\text{TnF}\alpha$ contrôle la transcription de l'EGFR sur plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses [361][362]. On sait également que l'EGFR est une cible transcriptionnelle de la β -Catenin [363]. Puisque les mutations de la β -Catenin sont fréquentes dans les carcinomes hépatocellulaire [364], cette protéine pourrait également jouer sur la réinduction de l'EGFR dans le cancer. Afin de comprendre quelles voies de signalisation contrôlent l'expression de l'EGFR dans le carcinome hépatocellulaire, nous pourrions mettre en place une analyse protéomique à grande échelle par puces, en discriminant entre les tumeurs exprimant et activant ou non l'EGFR sur les biopsies humaines de foies stéatosiques microdisséquées. Une autre approche par chromatine immunoprécipitation permettrait éventuellement d'identifier des facteurs de transcription ou répresseurs directs de l'EGFR sur ces nodules tumoraux chez l'Homme. Tout ceci pourrait nous aider à mettre en évidence certaines voies de signalisation suractivées et potentiellement responsables de l'expression ou de l'activation de la voie EGFR.

En définitive, approfondir les liens entre l'EGFR et la carcinogénèse hépatique permettrait de valider une nouvelle fois l'importance de cette voie de signalisation dans le contrôle de la prolifération hépatocytaire de façon plus générale, associée à différents contextes pathologiques et pas seulement au cours de la régénération hépatique post hépatectomie. D'autre part, ces résultats conduiraient à cibler plus finement des thérapies anti-tumorales liées à l'hépatocarcinome.

- [1] C. Power and J. Rasko, "Myth Busting Prometheus," *Radius*, pp. 20–22, 2009.
- [2] K. Lehmann, S. Breitenstein, and P. A. Clavien, "From Promethean to Modern Times," in *Malignant Liver Tumors : Current and Emerging Therapies*, 3rd edition, 2000, pp. 3–10.
- [3] J. L. E. Lay and K. H. Kaestner, "The Fox Genes in the Liver : From Organogenesis to Functional Integration," *Physiological reviews*, vol. 90, pp. 1–22, 2010.
- [4] R. Gebhardt, "Metabolic zonation of the liver : Regulation and implications for liver function," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 53, no. 3, pp. 275–354, 1992.
- [5] R. Malik, C. Selden, and H. Hodgson, "The role of non-parenchymal cells in liver growth," *Cell & Developmental Biology*, vol. 13, no. 02, pp. 425–431, 2002.
- [6] A. W. Thomson and P. a Knolle, "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 10, no. 11, pp. 753–66, Nov. 2010.
- [7] a Gardemann, H. Strulik, and K. Jungermann, "A portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for an insulin-dependent net glucose uptake in perfused rat liver.," *FEBS letters*, vol. 202, no. 2, pp. 255–9, Jul. 1986.
- [8] S. P. S. Monga, *Molecular Pathology of Liver Diseases*, Philippe T. Springer, 2010.
- [9] B. Yang and L. Bankir, "Urea and urine concentrating ability : new insights from studies in mice.," *American journal of physiology. Renal physiology*, vol. 288, no. 5, pp. F881–96, May 2005.
- [10] F. P. Guengerich, "Cytochrome P-450 3A4 : regulation and role in drug metabolism.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 39, pp. 1–17, Jan. 1999.
- [11] E. Halilbasic, T. Claudel, and M. Trauner, "Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond.," *Journal of hepatology*, vol. 58, no. 1, pp. 155–68, Jan. 2013.
- [12] D. A. Clark JM, Brancati FL, "Nonalcoholic fatty liver disease : The most common cause of abnormal liver enzymes in the U.S. population," *Gastroenterology*, vol. 120, no. Supplement, p. A65, 2001.
- [13] M. Adfler and F. Schaffner, "Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients.," *The American journal of medicine*, vol. 67, no. 5, pp. 811–816, 1979.
- [14] J. Ludwig, T. R. Viggiano, D. B. McGill, and B. J. Oh, "Nonalcoholic steatohepatitis : Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.," *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, vol. 55, no. 7, pp. 434–8, Jul. 1980.

[15] M. Machado and H. Cortez-Pinto, "Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance," *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 17, no. 8, pp. 823–826, Aug. 2005.

[16] Teresa Antonini, P. Brousse, and CHB, "Stéatose et Stéato-hépatite Métabolique (NASH)," 2012. [Online]. Available : <http://www.centre-hepatobiliaire.org/foieEtMaladies/maladies/steatose/index.phtml>.

[17] R. Rametta, E. Mozzi, P. Dongiovanni, B. M. Motta, M. Milano, G. Roviario, S. Fargion, and L. Valenti, "Increased insulin receptor substrate 2 expression is associated with steatohepatitis and altered lipid metabolism in obese subjects.," *International journal of obesity* (2005), vol. 37, no. 7, pp. 986–92, Jul. 2013.

[18] J. K. Dowman, J. W. Tomlinson, and P. N. Newsome, "Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease.," *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, vol. 103, no. 2, pp. 71–83, Feb. 2010.

[19] K. L. Donnelly, C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, and E. J. Parks, "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease," *The Journal of Clinical investigation*, vol. 115, no. 5, pp. 1343–1351, 2005.

[20] D. E. Kleiner, E. M. Brunt, M. Van Natta, C. Behling, M. J. Contos, O. W. Cummings, L. D. Ferrell, Y.-C. Liu, M. S. Torbenson, A. Unalp-Arida, M. Yeh, A. J. McCullough, and A. J. Sanyal, "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 41, no. 6, pp. 1313–21, Jun. 2005.

[21] C. P. Day and O. F. James, "Steatohepatitis : a tale of two 'hits' ?," *Gastroenterology*, vol. 114, no. 4, pp. 842–5, Apr. 1998.

[22] B. Fromenty, C. Fisch, G. Labbe, C. Degott, D. Deschamps, a Berson, P. Letteron, and D. Pessayre, "Amiodarone inhibits the mitochondrial beta-oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice.," *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 255, no. 3, pp. 1371–6, Dec. 1990.

[23] D. Deschamps, V. DeBeco, C. Fisch, B. Fromenty, A. Guillouzo, and D. Pessayre, "Inhibition by perhexiline of oxidative phosphorylation and the beta-oxidation of fatty acids : possible role in pseudoalcoholic liver lesions.," *Hepatology*, vol. 19, no. 4, pp. 948–961, 1994.

[24] Z. Li, J. a Oben, S. Yang, H. Lin, E. a Stafford, M. J. Soloski, S. a Thomas, and A. M. Diehl, "Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 40, no. 2, pp. 434–41, Aug. 2004.

[25] H. Tilg and A. R. Moschen, "Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease : the multiple parallel hits hypothesis.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 52, no. 5, pp. 1836–46, Nov. 2010.

[26] A. E. Feldstein, N. W. Werneburg, A. Canbay, M. E. Guicciardi, S. F. Bronk, R. Rydzewski, L. J. Burgart, and G. J. Gores, "Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 40, no. 1, pp. 185–94, Jul. 2004.

[27] L. H. Tetri, M. Basaranoglu, E. M. Brunt, L. M. Yerian, and B. A. Neuschwander-tetri, "Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent," *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 63110, pp. 987–995, 2008.

[28] M.-E. Dumas, R. H. Barton, A. Teye, O. Cloarec, C. Blancher, A. Rothwell, J. Fearnside, R. Tatoud, V. Blanc, J. C. Lindon, S. C. Mitchell, E. Holmes, M. I. McCarthy, J. Scott, D. Gauguier, and J. K. Nicholson, "Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 33, pp. 12511–6, Aug. 2006.

[29] J. M. Fernandez-Real, M. Vayreda, C. Richart, C. Gutierrez, M. Broch, J. Vendrell, and W. Ricart, "Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 86, no. 3, pp. 1154–9, Mar. 2001.

[30] M. Iwabuchi, T. Yamauchi, M. Okada-Iwabuchi, K. Sato, T. Nakagawa, M. Funata, M. Yamaguchi, S. Namiki, R. Nakayama, M. Tabata, H. Ogata, N. Kubota, I. Takamoto, Y. K. Hayashi, N. Yamauchi, H. Waki, M. Fukayama, I. Nishino, K. Tokuyama, K. Ueki, Y. Oike, S. Ishii, K. Hirose, T. Shimizu, K. Touhara, and T. Kadowaki, "Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1," *Nature*, vol. 464, no. 7293, pp. 1313–9, Apr. 2010.

[31] P. Dongiovanni, L. Valenti, R. Rametta, a K. Daly, V. Nobili, E. Mozzi, J. B. S. Leathart, a Pietro Battista, a D. Burt, M. Maggioni, a L. Fracanzani, E. Lattuada, M. a Zappa, G. Roviato, G. Marchesini, C. P. Day, and S. Fargion, "Genetic variants regulating insulin receptor signalling are associated with the severity of liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease," *Gut*, vol. 59, no. 2, pp. 267–73, Feb. 2010.

[32] S. Romeo, J. Kozlitina, C. Xing, A. Pertsemlidis, D. Cox, L. A. Pennacchio, E. Boerwinkle, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs, "Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease," *Nature genetics*, vol. 40, no. 12, pp. 1461–5, Dec. 2008.

[33] A. J. Sanyal, C. Campbell-Sargent, F. Mirshahi, W. B. Rizzo, M. J. Contos, R. K. Sterling, V. a Luketic, M. L. Shiffman, and J. N. Clore, "Nonal-

coholic steatohepatitis : association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.," *Gastroenterology*, vol. 120, no. 5, pp. 1183–92, Apr. 2001.

[34] C. C. Mottin, M. Moretto, A. V Padoin, A. M. Swarowsky, M. G. Toneto, L. Glock, and G. Repetto, "The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients.," *Obesity surgery*, vol. 14, no. 5, pp. 635–7, May 2004.

[35] G. Vernon, a Baranova, and Z. M. Younossi, "Systematic review : the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults.," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 34, no. 3, pp. 274–85, Aug. 2011.

[36] M. Lazo and J. M. Clark, "The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease : a global perspective.," *Seminars in liver disease*, vol. 28, no. 4, pp. 339–50, Nov. 2008.

[37] S. Jimba, T. Nakagami, M. Takahashi, T. Wakamatsu, Y. Hirota, Y. Iwamoto, and T. Wasada, "Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults.," *Diabetic Medicine : A journal of the British Diabetic Association*, vol. 22, no. 9, pp. 1141–5, 2005.

[38] L. Caballería, G. Pera, M. A. Auladell, P. Torán, L. Muñoz, D. Miranda, A. Alumà, J. D. Casas, C. Sánchez, D. Gil, J. Aubà, A. Tibau, S. Canut, J. Bernad, and M. M. Aizpurua, "Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain.," *European journal of gastroenterology & hepatology*, vol. 22, no. 1, pp. 24–32, Jan. 2010.

[39] S. Zelber-Sagi, R. Lotan, A. Shlomain, M. Webb, G. Harrari, A. Buch, D. Nitzan Kaluski, Z. Halpern, and R. Oren, "Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up.," *Journal of hepatology*, vol. 56, no. 5, pp. 1145–51, May 2012.

[40] J. a Welsh, S. Karpen, and M. B. Vos, "Increasing Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Among United States Adolescents, 1988-1994 to 2007-2010.," *The Journal of pediatrics*, pp. 1–6, Oct. 2012.

[41] V. de Lédinghen, V. Ratziu, X. Causse, B. Le Bail, D. Capron, C. Renou, C. Pilette, V. Oules, E. Gelsi, F. Oberti, A. Vallet-Pichard, N. Le Provost, and J.-F. Cadranel, "Diagnostic and predictive factors of significant liver fibrosis and minimal lesions in patients with persistent unexplained elevated transaminases. A prospective multicenter study.," *Journal of hepatology*, vol. 45, no. 4, pp. 592–9, Oct. 2006.

[42] J. Clark, "The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults.," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 40, no. Supplement 1, pp. S5–10, 2006.

[43] G. Musso, R. Gambino, F. De Michieli, M. Cassader, M. Rizzetto, M.

Durazzo, E. Fagà, B. Silli, and G. Pagano, "Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 37, no. 4, pp. 909–16, Apr. 2003.

[44] L. Perlemuter, G. Collin de l'Hortet, and J. Sélam, *Diabète et maladies métaboliques*, 4th ed. 2003.

[45] B. Caballero, "The global epidemic of obesity : an overview.," *Epidemiologic reviews*, vol. 29, no. 7, pp. 1–5, Jan. 2007.

[46] F. Luyckx, C. Desai, A. Thiry, W. Dewé, A. Scheen, J. Gielen, and P. Lefèbvre, "Liver abnormalities in severely obese subjects : effect of drastic weight loss after gastroplasty.," *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 22, no. 3, pp. 222–226, 1998.

[47] S. Bellentani, G. Saccoccio, F. Masutti, L. Crocè, G. Brandi, F. Sasso, G. Cristanini, and C. Tiribelli, "Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy.," *Annals of Internal Medicine*, vol. 132, no. 1, pp. 112–117, 2000.

[48] A. Franzese, P. Vajro, A. Argenziano, A. Puzziello, M. Iannucci, M. Saviano, F. Brunetti, and A. Rubino, "Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population.," *Digestive diseases and sciences*, vol. 42, no. 7, pp. 1428–1432, 1997.

[49] E. Ford, W. Giles, and W. Dietz, "Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults," *American Medical Association*, vol. 287, no. 3, pp. 356–359, 2002.

[50] Y.-M. Kwon, S.-W. Oh, S.-S. Hwang, C. Lee, H. Kwon, and G. E. Chung, "Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease With Components of Metabolic Syndrome According to Body Mass Index in Korean Adults.," *The American journal of gastroenterology*, no. May, pp. 1–7, Oct. 2012.

[51] B. J. Kim, N. H. Kim, B. S. Kim, and J. H. Kang, "The Association between Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Metabolic Syndrome and Arterial Stiffness in Nondiabetic, Nonhypertensive Individuals.," *Cardiology*, vol. 123, no. 1, pp. 54–61, Jan. 2012.

[52] D. Meeto, P. McGovern, and R. Safadi, "An epidemiological overview of diabetes across the world," *British Journal of Nursing*, vol. 16, no. 16, pp. 1002–1007, 2007.

[53] R. K. Schindhelm, R. J. Heine, and M. Diamant, "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients.," *Diabetes care*, vol. 30, no. 9, p. e94 ; author reply e95, Sep. 2007.

[54] N. Assy, K. Kaita, D. Mymin, C. Levy, B. Rosser, and G. Minuk, "Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients," *Digestive diseases and*

sciences, vol. 45, no. 10, pp. 1929–34, 2000.

[55] C. Matteoni, Z. Younossi, T. Gramlich, N. Boparai, Y. Liu, and A. McCullough, “Nonalcoholic Fatty Liver Disease : A Spectrum of Clinical and Pathological Severity,” *Gastroenterology*, vol. 116, pp. 1413–1419, 1999.

[56] a Poonawala, S. P. Nair, and P. J. Thuluvath, “Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis : a case-control study,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 32, no. 4 Pt 1, pp. 689–92, Oct. 2000.

[57] E. Bugianesi, “Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis : From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma,” *Gastroenterology*, vol. 123, no. 1, pp. 134–140, Jul. 2002.

[58] I. Liou and K. V Kowdley, “Natural history of nonalcoholic steatohepatitis,” *Journal of clinical gastroenterology*, vol. 40 Suppl 1, pp. S11–6, Mar. 2006.

[59] J. M. Hui, J. G. Kench, S. Chitturi, A. Sud, G. C. Farrell, K. Byth, P. Hall, M. Khan, and J. George, “Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 38, no. 2, pp. 420–7, Aug. 2003.

[60] V. Ratziu, L. Bonyhay, V. Di Martino, F. Charlotte, L. Cavallaro, M.-H. Sayegh-Tainturier, P. Giral, A. Grimaldi, P. Opolon, and T. Poynard, “Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 35, no. 6, pp. 1485–93, Jun. 2002.

[61] J. George, N. Pera, N. Phung, I. Leclercq, J. Yun Hou, and G. Farrell, “Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis,” *Journal of Hepatology*, vol. 39, no. 5, pp. 756–764, Nov. 2003.

[62] R. S. McCuskey, Y. Ito, G. R. Robertson, M. K. McCuskey, M. Perry, and G. C. Farrell, “Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 40, no. 2, pp. 386–93, Aug. 2004.

[63] J. C. Cohen, J. D. Horton, and H. H. Hobbs, “Human Fatty Liver Disease : Old Questions and New Insights Jonathan,” *Science*, vol. 332, no. 6037, pp. 1519–1523, 2011.

[64] T. Gramlich, D. E. Kleiner, A. J. McCullough, C. a Matteoni, N. Boparai, and Z. M. Younossi, “Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease,” *Human Pathology*, vol. 35, no. 2, pp. 196–199, Feb. 2004.

[65] V. Paradis, S. Zalinski, E. Chelbi, N. Guedj, F. Degos, V. Vilgrain, P. Bedossa, and J. Belghiti, “Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis : a pathological analysis,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 49, no. 3, pp. 851–9, Mar. 2009.

[66] E. J. Park, J. H. Lee, G.-Y. Yu, G. He, S. R. Ali, R. G. Holzer, C. H. Osterreicher, H. Takahashi, and M. Karin, "Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression.," *Cell*, vol. 140, no. 2, pp. 197–208, Jan. 2010.

[67] F. Bianchini, R. Kaaks, and H. Vainio, "Review Overweight , obesity , and cancer risk," vol. 3, no. September, pp. 565–574, 2002.

[68] E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-thurmond, and M. J. Thun, "Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 17, pp. 1625–1638, 2003.

[69] A. Ingalls, M. Dickie, and G. Snell, "Obese, a new mutation in the house mouse," *The Journal of Heredity*, vol. 41, no. 12, pp. 317–8, 1950.

[70] I. Shimomura, "Increased Levels of Nuclear SREBP-1c Associated with Fatty Livers in Two Mouse Models of Diabetes Mellitus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 42, pp. 30028–30032, Oct. 1999.

[71] U. Edvardsson, H. B. von Löwenhielm, O. Panfilov, A.-C. Nyström, F. Nilsson, and B. Dahlöf, "Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators.," *Proteomics*, vol. 3, no. 4, pp. 468–78, Apr. 2003.

[72] A. E. Brix, A. Elgavish, T. R. Nagy, B. a Gower, W. J. Rhead, and P. a Wood, "Evaluation of liver fatty acid oxidation in the leptin-deficient obese mouse.," *Molecular genetics and metabolism*, vol. 75, no. 3, pp. 219–26, Mar. 2002.

[73] E. C. Miller, U. Juhl, J. A. Miller, B. Chem, J. A. Miller, P. Amer, and A. Cancer, "Diabetes, a New Mutation in the Mouse," *Science*, vol. 153, pp. 1127–1128, 1966.

[74] D. Duhl, H. Vrieling, K. Miller, G. Wolff, and G. Barsh, "Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice," *Nature Genetics*, vol. 8, 1994.

[75] S. Kersten, J. Seydoux, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, B. Desvergne, and W. Wahli, "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 103, no. 11, pp. 1489–98, Jun. 1999.

[76] M. L. Martínez-Chantar, F. J. Corrales, L. A. Martínez-Cruz, E. R. García-Trevijano, Z.-Z. Huang, L. Chen, G. Kanel, M. a Avila, J. M. Mato, and S. C. Lu, "Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 16, no. 10, pp. 1292–4, Aug. 2002.

[77] W. S. Cook, S. Jain, Y. Jia, W. Q. Cao, a V Yeldandi, J. K. Reddy, and M. S. Rao, "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-responsive genes induced in the newborn but not prenatal liver of peroxisomal fatty

acyl-CoA oxidase null mice.,” *Experimental cell research*, vol. 268, no. 1, pp. 70–6, Aug. 2001.

[78] K. Hyun-Seok, X. Cuiying, W. Rui-Hong, L. Tyler, X. Xiaoling, A. Vassilopoulos, G. Vazquez-ortiz, W. Jeong, and O. Park, “Hepatic specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis,” *Cell Metabolism*, vol. 12, no. 3, pp. 224–236, 2011.

[79] R.-H. Wang, C. Li, and C.-X. Deng, “Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition.,” *International journal of biological sciences*, vol. 6, no. 7, pp. 682–90, Jan. 2010.

[80] R. Wang, H. Kim, C. Xiao, and X. Xu, “Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2 / Akt signaling and results in hyperglycemia , oxidative damage , and insulin resistance,” *The Journal of Clinical investigation*, vol. 121, no. 11, 2011.

[81] F. Benhamed, P. Denechaud, M. Lemoine, C. Robichon, M. Moldes, J. Bertrand-michel, V. Ratziau, L. Serfaty, C. Housset, J. Capeau, J. Girard, H. Guillou, and C. Postic, “The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 6, 2012.

[82] R. Dentin, F. Benhamed, I. Hainault, V. Fauveau, F. Foufelle, J. R. B. Dyck, J. Girard, and C. Postic, “Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice.,” *Diabetes*, vol. 55, no. 8, pp. 2159–70, Aug. 2006.

[83] Y. Fan, R. K. Menon, P. Cohen, D. Hwang, T. Clemens, D. J. DiGirolamo, J. J. Kopchick, D. Le Roith, M. Trucco, and M. a Sperling, “Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 30, pp. 19937–44, Jul. 2009.

[84] Y. Cui, A. Hosui, R. Sun, K. Shen, O. Gavrilova, W. Chen, M. C. Cam, B. Gao, G. W. Robinson, and L. Hennighausen, “Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatois and impaired liver regeneration.,” *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 46, no. 2, pp. 504–13, Aug. 2007.

[85] C. S. Lieber, M. A. Leo, K. M. Mak, Y. Xu, Q. Cao, C. Ren, A. Ponomarenko, and L. M. Decarli, “Model of nonalcoholic steatohepatitis,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, no. 1, pp. 502–509, 2004.

[86] L. H. Tetri, M. Basaranoglu, E. M. Brunt, L. M. Yerian, and B. a Neuschwander-Tetri, “Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent.,” *American*

journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, vol. 295, no. 5, pp. G987–95, Nov. 2008.

[87] M. Ogasawara, A. Hirose, M. Ono, K. Aritake, Y. Nozaki, M. Takahashi, N. Okamoto, S. Sakamoto, S. Iwasaki, T. Asanuma, T. Taniguchi, Y. Urade, S. Onishi, T. Saibara, and J. Oben, “A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-fat diet,” *Liver International*, vol. 31, no. 4, pp. 542–551, 2011.

[88] I. Shimomura, R. E. Hammer, J. a. Richardson, S. Ikemoto, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, “Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue : model for congenital generalized lipodystrophy,” *Genes & Development*, vol. 12, no. 20, pp. 3182–3194, Oct. 1998.

[89] B. Stiles, Y. Wang, A. Stahl, S. Bassilian, W. Lee, Y.-J. Kim, R. Sherwin, S. Devaskar, R. Lesche, M. Magnuson, and H. Hu, “Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 9, pp. 2082–2087, 2004.

[90] Y. Horie, A. Suzuki, E. Kataoka, T. Sasaki, K. Hamada, J. Sasaki, K. Mizuno, G. Hasegawa, H. Kishimoto, M. Iizuka, M. Naito, K. Enomoto, S. Watanabe, T. W. Mak, and T. Nakano, “Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, no. 12, 2004.

[91] T. Luedde, N. Beraza, V. Kotsikoris, G. van Loo, A. Nenci, R. De Vos, T. Roskams, C. Trautwein, and M. Pasparakis, “Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma,” *Cancer cell*, vol. 11, no. 2, pp. 119–32, Feb. 2007.

[92] J. S. Campbell, S. D. Hughes, D. G. Gilbertson, T. E. Palmer, M. S. Holdren, A. C. Haran, M. M. Odell, R. L. Bauer, H.-P. Ren, H. S. Haugen, M. M. Yeh, and N. Fausto, “Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 9, pp. 3389–94, Mar. 2005.

[93] J. S. White, “Straight talk about high-fructose corn syrup : what it is and what it,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 88, pp. 1716–1721, 2008.

[94] X. Ouyang, P. Cirillo, Y. Sautin, S. Mccall, J. L. Bruchette, A. M. Diehl, R. J. Johnson, and F. Abdelmalek, “Fructose Consumption as a Risk Factor for Non-alcoholic Fatty Liver Disease,” *Journal of hepatology*, vol. 48, no. 6, pp. 993–999, 2009.

[95] T. Kawasaki, K. Igarashi, T. Koeda, K. Sugimoto, K. Nakagawa,

S. Hayashi, R. Yamaji, H. Inui, T. Fukusato, and T. Yamanouchi, "Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis," *The Journal of Nutrition*, pp. 2067–2071, 2009.

[96] N. Matsuzawa, T. Takamura, S. Kurita, H. Misu, T. Ota, H. Ando, M. Yokoyama, M. Honda, Y. Zen, Y. Nakanuma, K.-I. Miyamoto, and S. Kaneko, "Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 46, no. 5, pp. 1392–403, Nov. 2007.

[97] C. Romestaing, M.-A. Piquet, D. Letexier, B. Rey, A. Mourier, S. Servais, M. Belouze, V. Rouleau, M. Dautresme, I. Ollivier, R. Favier, M. Rigoulet, C. Duchamp, and B. Sibille, "Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet.," *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 294, no. 1, pp. E110–9, Jan. 2008.

[98] A. Kulinski, D. E. Vance, and J. E. Vance, "A choline-deficient diet in mice inhibits neither the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein B secretion.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 23, pp. 23916–24, Jun. 2004.

[99] H. Oz, T. Chen, and M. Neuman, "Methionine Deficiency and Hepatic Injury in a Dietary Steatohepatitis Model," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 53, no. 3, pp. 767–776, 2008.

[100] M. D. Weltman, G. C. Farrell, P. Hall, M. Ingelman-Sundberg, and C. Liddle, "Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 27, no. 1, pp. 128–33, Jan. 1998.

[101] M. E. Rinella and R. M. Green, "The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance," *Journal of Hepatology*, vol. 40, no. 1, pp. 47–51, Jan. 2004.

[102] D. Gao, C. Wei, L. Chen, J. Huang, S. Yang, and A. M. Diehl, "Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease.," *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 287, no. 5, pp. G1070–7, Nov. 2004.

[103] H. Park, A. Ortmeyer, and D. Blankenbaker, "Cell Division during Regeneration in Hydra," *Nature*, vol. 227, pp. 617–619, 1970.

[104] T. Morgan, "An attempt to analyze the phenomena of polarity in Tubularia," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 1, no. 4, pp. 587–591, 1905.

[105] J. G. Fortner and L. H. Blumgart, "A historic perspective of liver surgery for tumors at the end of the millennium.," *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 193, no. 2, pp. 210–22, Aug. 2001.

[106] H. Tillmans, "Experimentelle und anatomische Untersuchungen ue-

ber Wunden der Leber und der Niere,” *Virchows Arch*, vol. 78, pp. 437 – 465, 1879.

[107] T. Gluck, “Ueber die Bedeutung physiologisch - chirurgischer Experimente an der Leber,” *Arch Klin Chir*, vol. 29, pp. 139 – 143, 1883.

[108] G. Higgins and R. Anderson, “Experimental pathology of the liver,” *Arch Pathol*, vol. 12, pp. 186–202, 1931.

[109] G. Pack, T. Miller, and R. Brasfield, “Total right hepatic lobectomy for cancer of the gallbladder ; report of three cases,” *Ann Surg*, vol. 142, pp. 6 – 16, 1955.

[110] B. Samstein and J. Emond, “Liver transplants from living related donors,” *Annual Review of Medicine*, vol. 1988, no. 2, pp. 147–160, 2000.

[111] R. Ghobrial, F. Amersi, and R. Busuttil, “Surgical advances in liver transplantation. Living related and split donors,” *Clinics in Liver Disease*, vol. 4, no. 3, pp. 553–565, 2000.

[112] A. M. Diehl, “Liver regeneration,” *Frontiers in Bioscience* 7, e301-314, July 1, 2002, pp. 301–314, 2002.

[113] C. Mitchell and H. Willenbring, “A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice,” *Nature protocols*, vol. 3, no. 7, pp. 1167–70, Jan. 2008.

[114] N. Fausto, J. S. Campbell, and K. J. Riehle, “Liver regeneration,” *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 43, no. 2 Suppl 1, pp. S45–53, Feb. 2006.

[115] K. Overturf, M. Al-dhalimy, C. Ou, and M. Finegold, “Serial Transplantation Reveals the Stem-Cell-Like Regenerative Potential of Adult Mouse Hepatocytes,” *American Journal of Pathology*, vol. 151, no. 5, pp. 1273–1280, 1997.

[116] X. Wang, H. Kiyokawa, M. B. Dennewitz, and R. H. Costa, “The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 26, pp. 16881–16886, 2002.

[117] R. Cornell, “Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration,” *The American journal of Physiology*, vol. 249, no. 5 Pt 2, pp. R551–562, 1985.

[118] C. W. Strey, M. Markiewski, D. Mastellos, R. Tudoran, L. a Spruce, L. E. Greenbaum, and J. D. Lambris, “The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 198, no. 6, pp. 913–23, Sep. 2003.

[119] M. Lesurtel, R. Graf, B. Aleil, D. J. Walther, Y. Tian, W. Jochum, C. Gachet, M. Bader, and P.-A. Clavien, “Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 312, no. 5770, pp. 104–7, Apr. 2006.

[120] E. Seki, H. Tsutsui, Y. Iimuro, T. Naka, G. Son, S. Akira, T. Kishimoto, K. Nakanishi, and J. Fujimoto, "Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 41, no. 3, pp. 443–50, Mar. 2005.

[121] D. B. Stolz, W. M. Mars, B. E. Petersen, T. Kim, and G. K. Michalopoulos, "Growth Factor Signal Transduction Immediately after Two-Thirds Partial Hepatectomy in the Rat," *American Association for Cancer Research*, pp. 3954–3960, 1999.

[122] J. S. Campbell, L. Prichard, F. Schaper, J. Schmitz, A. Stephenson-famy, M. E. Rosenfeld, G. M. Argast, P. C. Heinrich, and N. Fausto, "Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no. 10, pp. 1285–1292, 2001.

[123] Y. Yamada, I. Kirillova, J. Peschon, and N. Fausto, "Initiation of liver growth by tumor necrosis factor : Deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. February, pp. 1441–1446, 1997.

[124] P. Akerman, P. Cote, S. Yang, C. McLain, S. Nelson, G. Bagby, and A. Diehl, "Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy," *Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 263, no. 4, pp. 579–585, 1992.

[125] H. Hayashi, M. Nagaki, M. Imose, Y. Osawa, K. Kimura, S. Takai, M. Imao, T. Naiki, T. Kato, and H. Moriwaki, "Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice.," *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 25, no. 1, pp. 162–70, Feb. 2005.

[126] B. Knight and G. C. Yeoh, "TNF/LTalpha double knockout mice display abnormal inflammatory and regenerative responses to acute and chronic liver injury.," *Cell and tissue research*, vol. 319, no. 1, pp. 61–70, Jan. 2005.

[127] D. E. Cressman, L. E. Greenbaum, R. A. Deangelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli, and R. Taub, "Liver Failure and Defective Hepatocyte Regeneration in Interleukin-6-Deficient Mice," *Science*, vol. 274, no. 16, pp. 1379–1383, 1996.

[128] T. Wuestefeld, C. Klein, K. L. Streetz, U. Betz, J. Lauber, J. Buer, M. P. Manns, W. Müller, and C. Trautwein, "Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 13, pp. 11281–8, Mar. 2003.

[129] W. Li, X. Liang, C. Kellendonk, V. Poli, and R. Taub, "STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 32, pp. 28411–7,

Aug. 2002.

[130] R. Taub, "Liver regeneration : from myth to mechanism.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 5, no. 10, pp. 836–47, Oct. 2004.

[131] T. J. Delahunty and D. Rubinstein, "Accumulation and release of triglycerides by rat liver following partial hepatectomy.," *Journal of lipid research*, vol. 11, no. 6, pp. 536–43, Nov. 1970.

[132] G. Michalopoulos, H. D. Cianciulli, A. R. Novotny, A. D. Kligerman, S. C. Strom, and R. L. Jirtle, "Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture.," *Cancer research*, vol. 42, no. 11, pp. 4673–82, Nov. 1982.

[133] E. Shteyer, Y. Liao, L. J. Muglia, P. W. Hruz, and D. a Rudnick, "Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 40, no. 6, pp. 1322–32, Dec. 2004.

[134] M. a Fernández, C. Albor, M. Ingelmo-Torres, S. J. Nixon, C. Ferguson, T. Kurzchalia, F. Tebar, C. Enrich, R. G. Parton, and A. Pol, "Caveolin-1 is essential for liver regeneration.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 313, no. 5793, pp. 1628–32, Sep. 2006.

[135] R. Mayoral, A. Fernández-Martínez, R. Roy, L. Boscá, and P. Martín-Sanz, "Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 46, no. 3, pp. 813–22, Sep. 2007.

[136] E. P. Newberry, S. M. Kennedy, Y. Xie, J. Luo, S. E. Stanley, C. F. Semenkovich, R. M. Crooke, M. J. Graham, and O. Nicholas, "Altered Hepatic Triglyceride Content After Partial Hepatectomy Without Impaired Liver Regeneration in Multiple Murine Genetic Models," *Hepatology*, vol. 48, no. 4, pp. 1097–1105, 2008.

[137] D. a Rudnick and N. O. Davidson, "Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration.," *International journal of hepatology*, vol. 2012, p. 549241, Jan. 2012.

[138] S. Haga, M. Ozaki, H. Inoue, Y. Okamoto, W. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, and S. Todo, "The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 49, no. 1, pp. 204–14, Jan. 2009.

[139] Y. Miyaoka, K. Ebato, H. Kato, S. Arakawa, S. Shimizu, and A. Miyajima, "Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration.," *Current biology : CB*, vol. 22, no. 13, pp. 1166–75, Jul. 2012.

[140] M. Borowiak, A. N. Garratt, T. Wüstefeld, M. Strehle, C. Trautwein, and C. Birchmeier, "Met provides essential signals for liver regeneration.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, vol. 101, no. 29, pp. 10608–13, Jul. 2004.

[141] S. Paranjpe, W. C. Bowen, A. W. Bell, K. Nejak-Bowen, J.-H. Luo, and G. K. Michalopoulos, “Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 45, no. 6, pp. 1471–7, Jun. 2007.

[142] V. M. Factor, D. Seo, T. Ishikawa, P. Kaposi-Novak, J. U. Marquardt, J. B. Andersen, E. a Conner, and S. S. Thorgeirsson, “Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice,” *PloS one*, vol. 5, no. 9, Jan. 2010.

[143] K. J. Riehle, J. S. Campbell, R. S. McMahan, M. M. Johnson, R. P. Beyer, T. K. Bammler, and N. Fausto, “Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, no. 1, pp. 91–103, Jan. 2008.

[144] W. Li, X. Liang, C. Kellendonk, V. Poli, and R. Taub, “STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 32, pp. 28411–7, Aug. 2002.

[145] S. Haga, W. Ogawa, H. Inoue, K. Terui, T. Ogino, R. Igarashi, K. Takeda, S. Akira, S. Enosawa, H. Furukawa, S. Todo, and M. Ozaki, “Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice,” *Journal of hepatology*, vol. 43, no. 5, pp. 799–807, Nov. 2005.

[146] S. Haga, M. Ozaki, H. Inoue, Y. Okamoto, W. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, and S. Todo, “The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 49, no. 1, pp. 204–14, Jan. 2009.

[147] H. Talarmin, C. Rescan, S. Cariou, D. Glaise, G. Zanninelli, M. Bildeau, P. Loyer, C. Guguen-Guillouzo, and G. Baffet, “The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes,” *Molecular and cellular biology*, vol. 19, no. 9, pp. 6003–11, Sep. 1999.

[148] H. Steiling, T. Wüstefeld, P. Bugnon, M. Brauchle, R. Fässler, D. Teupser, J. Thiery, J. I. Gordon, C. Trautwein, and S. Werner, “Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration,” *Oncogene*, vol. 22, no. 28, pp. 4380–8, Jul. 2003.

[149] P. K. Awuah, K. N. Nejak-Bowen, and S. P. S. Monga, “Role and regulation of PDGFR α signaling in liver development and regeneration,” *The American journal of pathology*, vol. 182, no. 5, pp. 1648–58, May 2013.

[150] C. Desbois-Mouthon, D. Wendum, A. Cadoret, C. Rey, P. Leneuve, A. Blaise, C. Housset, F. Tronche, Y. Le Bouc, and M. Holzenberger, "Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 20, no. 6, pp. 773–5, Apr. 2006.

[151] T. Sakamoto, Z. Liu, N. Murase, T. Ezure, S. Yokomuro, V. Poli, and a J. Demetris, "Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 29, no. 2, pp. 403–11, Feb. 1999.

[152] J. S. Campbell, L. Prichard, F. Schaper, J. Schmitz, a Stephenson-Famy, M. E. Rosenfeld, G. M. Argast, P. C. Heinrich, and N. Fausto, "Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 107, no. 10, pp. 1285–92, May 2001.

[153] M. Shimizu, a Hara, M. Okuno, H. Matsuno, K. Okada, S. Ueshima, O. Matsuo, M. Niwa, K. Akita, Y. Yamada, N. Yoshimi, T. Uematsu, S. Kojima, S. L. Friedman, H. Moriwaki, and H. Mori, "Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice : impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 33, no. 3, pp. 569–76, Mar. 2001.

[154] L. Braun, J. E. Mead, M. Panzica, R. Mikumo, G. I. Bell, and N. Fausto, "Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration : a possible paracrine mechanism of growth regulation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 5, pp. 1539–43, Mar. 1988.

[155] J. LaMarre, M. a Hayes, G. K. Wollenberg, I. Hussaini, S. W. Hall, and S. L. Gonias, "An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 87, no. 1, pp. 39–44, Jan. 1991.

[156] R. S. Chari, D. T. Price, S. R. Sue, W. C. Meyers, R. L. Jirtle, and N. Carolina, "Down-Regulation of Transforming Growth Factor Beta Receptor Type In II and III during liver regeneration," *The American Journal of Surgery*, vol. 169, pp. 126–132, 1995.

[157] M. Date, K. Matsuzaki, M. Matsushita, Y. Tahashi, K. Sakitani, and K. Inoue, "Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury.," *Journal of hepatology*, vol. 32, no. 2, pp. 251–60, Feb. 2000.

[158] S. Oe, E. R. Lemmer, E. a Conner, V. M. Factor, P. Levéen, J. Larsson, S. Karlsson, and S. S. Thorgeirsson, "Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration

in mice.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 40, no. 5, pp. 1098–105, Nov. 2004.

[159] H. Gilgenkrantz and A. Collin de L'hortet, "New insights into liver regeneration.," *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, May 2011.

[160] W. Huang, K. Ma, J. Zhang, M. Qatanani, J. Cuvillier, J. Liu, B. Dong, X. Huang, and D. D. Moore, "Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration.," *Science* (New York, N.Y.), vol. 312, no. 5771, pp. 233–6, Apr. 2006.

[161] N. Péan, I. Doignon, I. Garcin, A. Besnard, B. Julien, B. Liu, S. Branchereau, A. Spraul, C. Guettier, L. Humbert, K. Schoonjans, D. Rainteau, and T. Tordjmann, "The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 58, no. 4, pp. 1451–60, Oct. 2013.

[162] I. Garcin and T. Tordjmann, "Calcium signalling and liver regeneration.," *International journal of hepatology*, vol. 2012, p. 630670, Jan. 2012.

[163] S. Togo, H. Makino, T. Kobayashi, T. Morita, T. Shimizu, T. Kubota, Y. Ichikawa, T. Ishikawa, Y. Okazaki, Y. Hayashizaki, and H. Shimada, "Mechanism of liver regeneration after partial hepatectomy using mouse cDNA microarray.," *Journal of hepatology*, vol. 40, no. 3, pp. 464–71, Mar. 2004.

[164] V. W. Keng, A. Villanueva, D. Y. Chiang, A. J. Dupuy, J. Barbara, I. Matise, K. A. T. Silverstein, A. Sarver, T. K. Starr, L. Tessarollo, L. S. Collier, S. Powers, S. W. Lowe, A. Nancy, N. G. Copeland, J. M. Llovet, and D. A. Largaespada, "A conditional transposon-based insertional mutagenesis screen for hepatocellular carcinoma-associated genes in mice," *Nature Biotechnology*, vol. 27, no. 3, pp. 264–274, 2009.

[165] G. Song, A. D. Sharma, G. R. Roll, R. Ng, A. Y. Lee, R. H. Blelloch, N. M. Frandsen, and H. Willenbring, "MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration.," *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 51, no. 5, pp. 1735–43, May 2010.

[166] T. Wuestefeld, M. Pesic, R. Rudalska, D. Dauch, T. Longerich, T.-W. Kang, T. Yevesa, F. Heinzmann, L. Hoenicke, A. Hohmeyer, A. Potapova, I. Rittelmeier, M. Jarek, R. Geffers, M. Scharfe, F. Klawonn, P. Schirmacher, N. P. Malek, M. Ott, A. Nordheim, A. Vogel, M. P. Manns, and L. Zender, "A Direct in vivo RNAi screen identifies MKK4 as a key regulator of liver regeneration.," *Cell*, vol. 153, no. 2, pp. 389–401, Apr. 2013.

[167] J. Y. Cho, K.-S. Suh, C. H. Kwon, N.-J. Yi, and K. U. Lee, "Mild hepatic steatosis is not a major risk factor for hepatectomy and regenerative power is not impaired.," *Surgery*, vol. 139, no. 4, pp. 508–15, Apr. 2006.

[168] C. J. Imber, S. D. St Peter, A. Handa, and P. J. Friend, "Hepatic steatosis and its relationship to transplantation.," *Liver transplantation : of-*

ficial publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, vol. 8, no. 5, pp. 415–23, May 2002.

[169] K. Behrns, G. Tsiotos, N. DeSouza, M. Krishna, J. Ludwig, and D. Nagomey, “Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection,” *Journal of Gastrointestinal Surgery*, vol. 2, no. 3, pp. 292–298, 1998.

[170] R. Martin, J. Wisecarver, S. Radio, R. Stratta, A. Langnas, K. Hirst, and S. B. Jr, “Frozen section evaluation of donor livers before transplantation,” *Transplantation*, vol. 56, no. 6, pp. 1403–1409, 1993.

[171] G. Tarantino, P. Conca, V. Basile, A. Gentile, D. Capone, G. Polichetti, and E. Leo, “A prospective study of acute drug-induced liver injury in patients suffering from non-alcoholic fatty liver disease,” *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, vol. 37, no. 6, pp. 410–5, Jun. 2007.

[172] P. G. Kele, E. J. van der Jagt, A. S. H. Gouw, T. Lisman, R. J. Porte, and M. T. de Boer, “The impact of hepatic steatosis on liver regeneration after partial hepatectomy,” *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 33, no. 3, pp. 469–75, Mar. 2013.

[173] F. Cauchy, S. Zalinski, S. Dokmak, D. Fuks, O. Farges, L. Castera, V. Paradis, and J. Belghiti, “Surgical treatment of hepatocellular carcinoma associated with the metabolic syndrome,” *The British journal of surgery*, vol. 100, no. 1, pp. 113–21, Jan. 2013.

[174] R. a DeAngelis, M. M. Markiewski, R. Taub, and J. D. Lambris, “A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha,” *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 42, no. 5, pp. 1148–57, Nov. 2005.

[175] S. Sydor, Y. Gu, M. Schlattjan, L. P. Bechmann, U. Rauen, J. Best, A. Paul, H. a Baba, J.-P. Sowa, G. Gerken, and A. Canbay, “Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy,” *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology*, vol. 93, no. 1, pp. 20–30, Jan. 2013.

[176] O. Kučera, T. Roušar, P. Staňková, L. Haňáčková, H. Lotková, M. Podhola, and Z. Cervinková, “Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen,” *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 27, no. 2, pp. 323–30, Feb. 2012.

[177] I. a Leclercq, J. Field, and G. C. Farrell, “Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury,” *Gastroenterology*, vol. 124, no. 5, pp. 1451–1464, May 2003.

[178] S. Q. Yang, H. Z. Lin, a K. Mandal, J. Huang, and a M. Diehl, “Dis-

rupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers : implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 34, no. 4 Pt 1, pp. 694–706, Oct. 2001.

[179] M. Torbenson, S. Q. Yang, H. Z. Liu, J. Huang, W. Gage, and A. M. Diehl, “STAT-3 overexpression and p21 up-regulation accompany impaired regeneration of fatty livers,” *The American journal of pathology*, vol. 161, no. 1, pp. 155–61, Jul. 2002.

[180] C. a Redaelli, D. Semela, F. E. Carrick, M. Ledermann, D. Candinas, B. Sauter, and J.-F. Dufour, “Effect of vascular endothelial growth factor on functional recovery after hepatectomy in lean and obese mice,” *Journal of Hepatology*, vol. 40, no. 2, pp. 305–312, Feb. 2004.

[181] I. a Leclercq, M. Vansteenbergh, V. B. Lebrun, N. K. VanHul, J. Abarca-Quinones, C. L. Sempoux, C. Picard, P. Stärkel, and Y. L. Horsmans, “Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin,” *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology*, vol. 86, no. 11, pp. 1161–71, Nov. 2006.

[182] M. Selzner and P. a Clavien, “Failure of regeneration of the steatotic rat liver : disruption at two different levels in the regeneration pathway,” *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 31, no. 1, pp. 35–42, Jan. 2000.

[183] H. Yamauchi, K. Uetsuka, T. Okada, H. Nakayama, and K. Doi, “Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice,” *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, vol. 54, no. 4, pp. 281–6, Mar. 2003.

[184] H. Murata, T. Yagi, H. Iwagaki, T. Ogino, H. Sadamori, H. Matsukawa, Y. Umeda, S. Haga, N. Takaka, and M. Ozaki, “Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model,” *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 22, no. 12, pp. 2173–80, Dec. 2007.

[185] B. H. Zhang, M. Weltman, and G. C. Farrell, “Does steatohepatitis impair liver regeneration ? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats,” *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 14, no. 2, pp. 133–7, Feb. 1999.

[186] R. Veteläinen, A. K. van Vliet, and T. M. van Gulik, “Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy,” *Annals of surgery*, vol. 245, no. 1, pp. 44–50, Jan. 2007.

[187] H. Marsman, W. de Graaf, M. Heger, R. van Golen, F. Ten Kate, R. Bennink, and T. van Gulik, “Hepatic regeneration and functional recovery following partial liver resection in an experimental model of hepatic steatosis treated with omega-3 fatty acids,” *The British journal of surgery*, vol. 100, no. 5, pp. 674–683, 2013.

[188] C. Picard, L. Lambotte, P. Starkel, C. Sempoux, A. Saliez, V. Van

den Berge, and Y. Horsmans, "Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats.," *Journal of hepatology*, vol. 36, no. 5, pp. 645–52, May 2002.

[189] M. Rao, K. P. A. Reddy, M. Abecassis, and T. Hashimoto, "Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats," *Digestive diseases and sciences*, vol. 46, no. 9, pp. 1821–1826, 2001.

[190] M. Hamano, H. Ezaki, S. Kiso, K. Furuta, M. Egawa, T. Kizu, N. Chatani, Y. Kamada, Y. Yoshida, and T. Takehara, "Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis.," *Journal of gastroenterology*, Mar. 2013.

[191] S. Tanoue, H. Uto, R. Kumamoto, S. Arima, S. Hashimoto, Y. Nasu, Y. Takami, A. Moriuchi, T. Sakiyama, M. Oketani, A. Ido, and H. Tsubouchi, "Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 407, no. 1, pp. 163–8, Apr. 2011.

[192] M. Rao and J. Reddy, "The effect of microvesicular fatty change on liver regeneration after partial hepatectomy," *Hepatogastroenterology*, vol. 47, no. 34, pp. 912–915, 2000.

[193] T. Aoyama, K. Ikejima, K. Kon, K. Okumura, K. Arai, and S. Watanabe, "Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A(y) mice.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 49, no. 5, pp. 1636–44, May 2009.

[194] A. W. Burgess, "EGFR family : structure physiology signalling and therapeutic targets.," *Growth factors (Chur, Switzerland)*, vol. 26, no. 5, pp. 263–74, Oct. 2008.

[195] S. Cohen and G. A. Elliott, "The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse.," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 40, pp. 1–5, Jan. 1963.

[196] A. B. Singh and R. C. Harris, "Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands.," *Cellular signalling*, vol. 17, no. 10, pp. 1183–93, Oct. 2005.

[197] D. W. Threadgill, a a Dlugosz, L. a Hansen, T. Tennenbaum, U. Lichti, D. Yee, C. LaMantia, T. Mourton, K. Herrup, and R. C. Harris, "Targeted disruption of mouse EGF receptor : effect of genetic background on mutant phenotype.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 269, no. 5221, pp. 230–4, Jul. 1995.

[198] A. L. Schechter, D. F. Stern, L. Vaidyanathan, S. J. Decker, J. A. Drebin, M. I. Greene, and R. A. Weinberg, "The neu oncogene : an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen.," *Nature*, vol. 312, no.

5994, pp. 513–6, 1984.

[199] D. J. Riese and D. F. Stern, “Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network,” *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, vol. 20, no. 1, pp. 41–8, Jan. 1998.

[200] A. Collin de l’Hortet, H. Gilgenkrantz, and J.-E. Guidotti, “EGFR : A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration,” *International journal of hepatology*, vol. 2012, p. 476910, Jan. 2012.

[201] G. Levkowitz, H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W. Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger, and Y. Yarden, “c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor,” *Genes & Development*, vol. 12, no. 23, pp. 3663–3674, Dec. 1998.

[202] K. Roepstorff, M. V. Grandal, L. Henriksen, S. L. J. Knudsen, M. Lerdrup, L. Grøvdal, B. M. Willumsen, and B. van Deurs, “Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor,” *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 10, no. 8, pp. 1115–27, Aug. 2009.

[203] S. Y. Lin, K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon, and M. C. Hung, “Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor,” *Nature cell biology*, vol. 3, no. 9, pp. 802–8, Sep. 2001.

[204] H.-W. Lo, X. Cao, H. Zhu, and F. Ali-Osman, “Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes,” *Molecular cancer research : MCR*, vol. 8, no. 2, pp. 232–45, Feb. 2010.

[205] R. S. Carver, M. C. Stevenson, L. a Scheving, and W. E. Russell, “Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration,” *Gastroenterology*, vol. 123, no. 6, pp. 2017–27, Dec. 2002.

[206] A. Natarajan, B. Wagner, and M. Sibilis, “The EGF receptor is required for efficient liver regeneration,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 43, pp. 17081–6, Oct. 2007.

[207] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, “Untangling the ErbB signalling network,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 2, no. 2, pp. 127–37, Feb. 2001.

[208] A. Wells, “EGF receptor,” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 31, pp. 637–643, 1999.

[209] J. a Krall, E. M. Beyer, and G. MacBeath, “High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways,” *PloS one*, vol. 6, no. 1, p. e15945, Jan. 2011.

[210] A. Ullrich and J. Schlessinger, “Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity,” *Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 203–12, Apr. 1990.

[211] G. A. Rodrigues, M. Falasca, Z. Zhang, S. H. W. A. Ong, and J.

Schlessinger, "A Novel Positive Feedback Loop Mediated by the Docking Protein Gab1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling," *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 4, pp. 1448–1459, 2000.

[212] H. Shao, H. Y. Cheng, R. G. Cook, and D. J. Tweardy, "Identification and Characterization of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Recruitment Sites within the Epidermal Growth Factor Receptor Identification and Characterization of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Recruitment S," *Cancer research*, vol. 63, pp. 3923–3930, 2003.

[213] T. K. Guren, J. Ødegård, H. Abrahamsen, G. H. Thoresen, M. Susa, Y. Andersson, E. Østby, and T. Christoffersen, "EGF receptor-mediated, c-Src-dependent, activation of Stat5b is downregulated in mitogenically responsive hepatocytes.," *Journal of cellular physiology*, vol. 196, no. 1, pp. 113–23, Jul. 2003.

[214] D. Rotin, A. M. Honeggers, B. L. Margolisll, A. Ullrich, and J. Schlessingers, "Presence of SH2 Domains of Phospholipase C γ Enhances Substrate Phosphorylation by Increasing the Affinity toward the Epidermal Growth Factor Receptor *," *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, pp. 9678–9683, 1992.

[215] G. Carpenter and Q. Ji, "Phospholipase C- γ as a Signal-Transducing Element," *Experimental cell research*, vol. 253, pp. 15–24, 1999.

[216] D. Geoffrey, J. Locker, W. C. Bowen, B. E. Petersen, S. Katyal, S. C. Strom, A. Howard, and G. K. Michalopoulos, "Population Expansion, Clonal Growth, and Specific Differentiation Patterns in Primary Cultures of Hepatocytes Induced by HGF/SF, EGF and TGF α in a Chemically Defined (HGM) Medium," *The Journal of cell biology*, vol. 132, no. 6, pp. 1133–1149, 1996.

[217] N. Ito, S. Kawata, S. Tamura, S. Kiso, H. Tsushima, D. Damm, J. A. Abraham, S. Higashiyama, N. Taniguchi, and Y. Matsuzawa, "Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 198, no. 1, pp. 25–31, Jan. 1994.

[218] N. Fausto, A. D. Laird, and E. M. Webber, "Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration," *Faseb Journal*, vol. 9, pp. 1527–1536, 1995.

[219] D. B. Stolz, W. M. Mars, B. E. Petersen, T. Kim, and G. K. Michalopoulos, "Growth Factor Signal Transduction Immediately after Two-Thirds Partial Hepatectomy in the Rat," *Cancer research*, vol. 59, pp. 3954–3960, 1999.

[220] C. Mitchell, "Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth

Factor Links Hepatocyte Priming with Cell Cycle Progression during Liver Regeneration,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 4, pp. 2562–2568, Nov. 2004.

[221] S. Kiso, S. Kawata, S. Tamura, Y. Inui, Y. Yoshida, Y. Sawai, S. Umeki, N. Ito, A. Yamada, J.-I. Miyagawa, S. Higashiyama, T. Iwawaki, M. Saito, N. Taniguchi, Y. Matsuzawa, and K. Kohno, “Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy,” *Gastroenterology*, vol. 124, no. 3, pp. 701–7, Mar. 2003.

[222] D. E. Jones, R. Tran-Patterson, D. M. Cui, D. Davin, K. P. Estell, and D. M. Miller, “Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration,” *The American journal of physiology*, vol. 268, no. 5 Pt 1, pp. G872–8, May 1995.

[223] C. Berasain, E. R. García-Trevijano, J. Castillo, E. Erroba, D. C. Lee, J. Prieto, and M. a. Avila, “Amphiregulin : An early trigger of liver regeneration in mice,” *Gastroenterology*, vol. 128, no. 2, pp. 424–432, Feb. 2005.

[224] W. E. Russell, W. K. Kaufmann, S. Sitaric, N. C. Luetkeke, and D. C. Lee, “Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor- α -targeted mice,” *Molecular carcinogenesis*, vol. 15, no. 3, pp. 183–9, Mar. 1996.

[225] L. a Scheving, L. Zhang, M. C. Stevenson, E. S. Kwak, and W. E. Russell, “The emergence of ErbB2 expression in cultured rat hepatocytes correlates with enhanced and diversified EGF-mediated signaling,” *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 291, no. 1, pp. G16–25, Jul. 2006.

[226] S.-E. Kim and K.-Y. Choi, “EGF receptor is involved in WNT3a-mediated proliferation and motility of NIH3T3 cells via ERK pathway activation,” *Cellular signalling*, vol. 19, no. 7, pp. 1554–64, Jul. 2007.

[227] G. Van Buren, A. D. Yang, N. a Dallas, M. J. Gray, S. J. Lim, L. Xia, F. Fan, R. Somcio, Y. Wu, D. J. Hicklin, and L. M. Ellis, “Effect of molecular therapeutics on liver regeneration in a murine model,” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 11, pp. 1836–42, Apr. 2008.

[228] S. Paranjpe, W. C. Bowen, G. C. Tseng, J.-H. Luo, A. Orr, and G. K. Michalopoulos, “RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats,” *The American journal of pathology*, vol. 176, no. 6, pp. 2669–81, Jun. 2010.

[229] J. E. de Larco and G. J. Todaro, “Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75, no. 8, pp. 4001–5, Aug. 1978.

[230] M. A. Anzano, A. B. Roberts, C. A. Meyers, J. M. Smith, and B. Sporn, "Communication : Synergistic Interaction of Two Classes of Transforming Growth Factors from Murine Sarcoma Cells Synergistic Interaction of Two Classes of Transforming Growth Factors from Murine Sarcoma Cells," *Cancer research*, vol. 42, pp. 4776–4778, 1982.

[231] Y. Shi and J. Massague, "Mechanisms of TGF-beta Signaling from Cell Membrane to the Nucleus," *Cell*, vol. 113, no. Figure 2, pp. 685–700, 2003.

[232] D. Horbelt, A. Denkis, and P. Knaus, "A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling : Background matters.," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 44, no. 3, pp. 469–74, Mar. 2012.

[233] F. Clotman, P. Jacquemin, N. Plumb-Rudewiez, C. E. Pierreux, P. Van der Smissen, H. C. Dietz, P. J. Courtoy, G. G. Rousseau, and F. P. Lemaigre, "Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors.," *Genes & development*, vol. 19, no. 16, pp. 1849–54, Aug. 2005.

[234] D. M. Bissell, D. Roulot, and J. George, "Transforming growth factor beta and the liver.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 34, no. 5, pp. 859–67, Nov. 2001.

[235] B. J. Warner, S. W. Blain, J. Seoane, and J. Massagué, "Myc down-regulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway.," *Molecular and cellular biology*, vol. 19, no. 9, pp. 5913–22, Sep. 1999.

[236] M. G. Alexandrow and H. L. Moses, "Transforming Growth Factor β and Cell Cycle Regulation," *Cancer research*, vol. 55, pp. 1452–1457, 1995.

[237] K. E. H. Amasaki, Y. U. J. I. K. Ato, K. A. E. Guchi, and N. O. I. Shii, "Activation of Caspase-8 in Transforming Growth Factor-Beta – Induced Apoptosis of Human Hepatoma Cells," *Hepatology*, vol. 1, pp. 1215–1222, 1999.

[238] R.-H. Chen, "Interleukin-6 Inhibits Transforming Growth Factor-beta -induced Apoptosis through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Pathways," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 33, pp. 23013–23019, Aug. 1999.

[239] A. Ribeiro, S. F. Bronk, P. J. Roberts, R. Urrutia, and G. J. Gores, "The Transforming Growth Factor Beta 1 – Inducible Transcription Factor , TIEG1 , Mediates Apoptosis Through Oxidative Stress," *Hepatology*, vol. 30, no. 6, pp. 1490–1497, 1999.

[240] M. A. Y. Amamoto, K. A. O. Gawa, M. A. M. Orita, and K. A. F. Ukuda, "The Herbal Medicine Inchin-ko-to Inhibits Liver Cell Apoptosis Induced by Transforming Growth Factor Beta 1," *Hepatology*, vol. 23, no. 3,

pp. 552–559, 1996.

[241] K. F. Uruta, S. M. Isao, K. T. Akahashi, T. T. Agaya, Y. F. Ukuzawa, and T. I. Shikawa, “Gene mutation of transforming growth factor beta 1 type II receptor in hepatocellular carcinoma,” *International Journal of Cancer*, vol. 853, no. November 1998, pp. 851–853, 1999.

[242] M. C. Yakicier, M. B. Irmak, A. Romano, M. Kew, and M. Ozturk, “Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma,” *Oncogene*, vol. 4, no. 18, pp. 4879–4883, 1999.

[243] D. M. Bissell, S. Wang, W. R. Jamagin, and F. J. Roll, “Cell-specific Expression of Transforming Growth Factor-Beta in Rat Liver Evidence for Autocrine Regulation of Hepatocyte Proliferation,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 96, no. July, pp. 447–455, 1995.

[244] T. Nakamura, Y. Tomita, R. Hirai, K. Yamaoka, K. Kaji, and A. Ichihara, “Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 133, no. 3, pp. 1042–50, Dec. 1985.

[245] W. M. Mars, T. Kim, D. B. Stolz, M. Liu, and G. K. Michalopoulos, “Presence of Urokinase in Serum-free Primary Rat Hepatocyte Cultures and Its Role in Activating Hepatocyte Growth Factor,” *Cancer research*, vol. 56, pp. 2837–2843, 1996.

[246] R. L. Jirtle, B. I. Carrll, and C. D. Scott, “Modulation of Insulin-like Growth Factor-II/Mannose 6-Phosphate Receptors and Transforming Growth Factor-Beta 1 during Liver Regeneration,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 266, no. 33, pp. 22444–22450, 1991.

[247] W. E. Russell, R. J. Coffey, A. J. Ouellette, and H. L. Mosest, “Type Beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. July, pp. 5126–5130, 1988.

[248] K. A. Houck and G. K. Michalopoulos, “Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta,” *Journal of cellular physiology*, vol. 141, no. 3, pp. 503–9, Dec. 1989.

[249] M. Macias-Silva, W. Li, J. I. Leu, M. A. S. Crissey, and R. Taub, “Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 32, pp. 28483–90, Aug. 2002.

[250] M. Oshima, H. Oshima, and M. M. Taketo, “TGF-Beta Receptor Type II Deficiency Results in Defects of Yolk Sac Hematopoiesis and Vasculogenesis,” *Developmental Biology*, vol. 302, no. 0259, pp. 297–302, 1996.

[251] J. Romero-gallo, E. G. Sozmen, A. Chytil, W. E. Russell, W. T.

Parks, M. S. Holdren, M. F. Her, S. Gautam, H. L. Moses, and W. M. Grady, "Inactivation of TGF- β signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy," *Oncogene*, no. December 2004, pp. 3028–3041, 2005.

[252] H. Yasuda, T. Mine, H. Shibata, Y. Eto, and Y. Hasegawa, "Activin A : An Autocrine Inhibitor of Initiation of DNA Synthesis in Rat Hepatocytes," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 92, no. September, pp. 1491–1496, 1993.

[253] J. Ho, C. de Guise, C. Kim, S. Lemay, X.-F. Wang, and J.-J. Lebrun, "Activin induces hepatocyte cell growth arrest through induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B and Sp1.," *Cellular signalling*, vol. 16, no. 6, pp. 693–701, Jun. 2004.

[254] K. Kogure, W. Omata, M. Kanzaki, Y. Q. Zhang, H. Yasuda, T. Mine, and I. Kojima, "A single intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats.," *Gastroenterology*, vol. 108, no. 4, pp. 1136–42, Apr. 1995.

[255] K. Takabe, L. Wang, A. M. O. Leal, L. a Macconell, E. Wiater, T. Tomiya, A. Ohno, I. M. Verma, and W. Vale, "Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 38, no. 5, pp. 1107–15, Nov. 2003.

[256] A. Menthena, C. I. Koehler, J. S. Sandhu, M. I. Yovchev, E. Hurston, D. a Shafritz, and M. Oertel, "Activin A, p15INK4b signaling, and cell competition promote stem/progenitor cell repopulation of livers in aging rats.," *Gastroenterology*, vol. 140, no. 3, pp. 1009–20, Mar. 2011.

[257] A. Vijayakumar, S. Yakar, and D. Leroith, "The intricate role of growth hormone in metabolism.," *Frontiers in endocrinology*, vol. 2, no. September, p. 32, Jan. 2011.

[258] L. S. Argetsinger, G. S. Campbell, X. Yang, B. a Witthuhn, O. Silvennoinen, J. N. Ihle, and C. Carter-Su, "Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase.," *Cell*, vol. 74, no. 2, pp. 237–44, Jul. 1993.

[259] L. S. Argetsinger, J. K. Kouadio, A. Stensballe, O. N. Jensen, H. Steen, and C. Carter-su, "Autophosphorylation of JAK2 on Tyrosines 221 and 570 Regulates Its Activity," *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 22, pp. 4955–4967, 2004.

[260] L. H. Hansen, X. Wang, J. J. Kopchick, P. Bouchelouche, J. H. Nielsen, E. D. Galsgaard, and N. Billestrup, "Identification of Tyrosine Residues in the Intracellular Domain of the Growth Hormone Receptor Required for Transcriptional Signaling and Stat5 Activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 21, pp. 12669–12673, May 1996.

[261] J. E. Rowland, A. M. Lichanska, M. Linda, M. White, E. M. Aniello,

S. L. Maher, R. Brown, R. D. Teasdale, P. G. Noakes, M. J. Waters, and L. M. Kerr, "In Vivo Analysis of Growth Hormone Receptor Signaling Domains and Their Associated Transcripts In Vivo Analysis of Growth Hormone Receptor Signaling Domains and Their Associated Transcripts," *Molecular and cellular biology*, vol. 25, no. 1, pp. 66–77, 2005.

[262] A. J. Brooks and M. J. Waters, "The growth hormone receptor : mechanism of activation and clinical implications.," *Nature reviews. Endocrinology*, vol. 6, no. 9, pp. 515–25, Sep. 2010.

[263] J. VanderKuur, G. Allevato, N. Billestrup, G. Norstedt, and C. Carter-Su, "Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of Shc proteins and Shc association with Grb2," *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 13, pp. 7587–7593, 1995.

[264] J. A. Vanderkuur, E. R. Butch, S. B. Waters, J. E. Pessin, K. L. Guan, and C. Carter-Su, "Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation.," *Endocrinology*, vol. 138, no. 10, pp. 4301–7, Oct. 1997.

[265] J. L. Barclay, L. M. Kerr, L. Arthur, J. E. Rowland, C. N. Nelson, M. Ishikawa, E. M. d'Aniello, M. White, P. G. Noakes, and M. J. Waters, "In vivo targeting of the growth hormone receptor (GHR) Box1 sequence demonstrates that the GHR does not signal exclusively through JAK2.," *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, vol. 24, no. 1, pp. 204–17, Jan. 2010.

[266] N. J. Lanning and C. Carter-Su, "Recent advances in growth hormone signaling.," *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, vol. 7, no. 4, pp. 225–35, Dec. 2006.

[267] J. V Santiago, W. L. Clarke, S. D. Shah, and P. E. Cryer, "Epinephrine, norepinephrine, glucagon, and growth hormone release in association with physiological decrements in the plasma glucose concentration in normal and diabetic man.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 51, no. 4, pp. 877–83, Oct. 1980.

[268] G. M. Cremer, J. M. Bilstad, C. Faiman, and K. E. Moxness, "Circulating levels of anterior pituitary hormones and insulin after arginine infusion.," *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, vol. 43, no. 11, pp. 776–82, Nov. 1968.

[269] D. G. Johnston, R. R. Davies, and R. W. Prescott, "Regulation of growth hormone secretion in man : a review.," *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 78, no. 4, pp. 319–27, Apr. 1985.

[270] M. Hartman, J. Verldhuis, and M. Thorner, "Normal control of growth hormone secretion," *Hormone Research*, vol. 40, no. 1–3, p. 37)47, 1993.

[271] S. Okada and J. J. Kopchick, "Biological effects of growth hormone

and its antagonist.," *Trends in molecular medicine*, vol. 7, no. 3, pp. 126–32, Mar. 2001.

[272] J. J. Orrego, E. Dimaraki, K. Symons, and A. L. Barkan, "Physiological testosterone replenishment in healthy elderly men does not normalize pituitary growth hormone output : evidence against the connection between senile hypogonadism and somatopause.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 89, no. 7, pp. 3255–60, Jul. 2004.

[273] Z. Laron, A. Pertzalan, and S. Mannheimer, "Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone—a new inborn error of metabolism?," *Israel journal of medical sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 152–5, 1966.

[274] E. M. Kofoed, V. Hwa, B. Little, K. A. Woods, C. K. Buckway, J. Tsubaki, K. L. Pratt, L. Bezrodnik, H. Jasper, A. Tepper, J. J. Heinrich, and R. G. Rosenfeld, "Growth Hormone Insensitivity Associated with a STAT5b Mutation," *The New England journal of medicine*, vol. 349, no. 12, pp. 1139–1147, 2003.

[275] C. Kenyon, J. Chang, E. Gensch, A. Rudner, and R. Tabtiang, "A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type.," *Nature*, vol. 366, no. 6454, pp. 461–4, Dec. 1993.

[276] M. Holzenberger, J. Dupont, B. Ducos, P. Leneuve, A. Gélöën, P. C. Even, P. Cervera, and Y. Le Bouc, "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice.," *Nature*, vol. 421, no. 6919, pp. 182–7, Jan. 2003.

[277] J. Guevara-Aguirre, P. Balasubramanian, M. Guevara-Aguirre, M. Wei, F. Madia, C. Cheng, D. Hwang, A. Martin-Montalvo, J. Saavedra, S. Ingles, R. de Cabo, P. Cohen, and V. Longo, "Growth Hormone Receptor Deficiency is Associated With a Major Reduction in Pro-aging Signaling, Cancer and Diabetes in Humans," *Science translational medicine*, vol. 3, no. 70, 2012.

[278] B. Richelsen, S. B. Pedersen, K. Kristensen, J. D. Børglum, H. Nørrelund, J. S. Christiansen, and J. O. L. Jørgensen, "Regulation of Lipoprotein Lipase and Hormone-Sensitive Lipase Activity and Gene Expression in Adipose and Muscle Tissue by Growth Hormone Treatment During Weight Loss in Obese Patients," *Metabolism*, vol. 49, no. 7, pp. 906–911, 2000.

[279] W. H. Daughaday, K. Hall, M. S. Raben, W. D. Salmon, J. L. van den Brande, and J. J. van Wyk, "Somatomedin : proposed designation for sulphation factor.," *Nature*, vol. 235, no. 5333, p. 107, Jan. 1972.

[280] J. P. Liu, J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis, "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r).," *Cell*, vol. 75, no. 1, pp. 59–72, Oct. 1993.

[281] J. Wang, J. Zhou, and C. a Bondy, "Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 13, no. 14, pp. 1985–90, Nov. 1999.

[282] K. E. Govoni, J. E. Wergedal, L. Florin, P. Angel, D. J. Baylink, and S. Mohan, "Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type 1alpha2-expressing cells results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion.," *Endocrinology*, vol. 148, no. 12, pp. 5706–15, Dec. 2007.

[283] K. R. Short, N. Møller, M. L. Bigelow, J. Coenen-Schimke, and K. S. Nair, "Enhancement of muscle mitochondrial function by growth hormone.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 93, no. 2, pp. 597–604, Feb. 2008.

[284] A. Sotiropoulos, M. Ohanna, C. Kedzia, R. K. Menon, J. J. Kopchick, P. a Kelly, and M. Pende, "Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 19, pp. 7315–20, May 2006.

[285] F. Ghanaat and J. a Tayek, "Growth hormone administration increases glucose production by preventing the expected decrease in glycogenolysis seen with fasting in healthy volunteers.," *Metabolism : clinical and experimental*, vol. 54, no. 5, pp. 604–9, May 2005.

[286] C. Höybye, V. Chandramouli, S. Efendic, A.-L. Hulting, B. R. Landau, W. C. Schumann, and A. Wajngot, "Contribution of gluconeogenesis and glycogenolysis to hepatic glucose production in acromegaly before and after pituitary microsurgery.," *Hormone and metabolic research*, vol. 40, no. 7, pp. 498–501, Jul. 2008.

[287] Y. Cho, M. Ariga, Y. Uchijima, K. Kimura, J.-Y. Rho, Y. Furuhashi, F. Hakuno, K. Yamanouchi, M. Nishihara, and S.-I. Takahashi, "The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats.," *Endocrinology*, vol. 147, no. 11, pp. 5374–84, Nov. 2006.

[288] R. Lindberg-Larsen, N. Møller, O. Schmitz, S. Nielsen, M. Andersen, H. Orskov, and J. O. L. Jørgensen, "The impact of pegvisomant treatment on substrate metabolism and insulin sensitivity in patients with acromegaly.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 92, no. 5, pp. 1724–8, May 2007.

[289] B. P. Neve, N. Hoogerbrugge, A. J. Verhoeven, J. C. Birkenhäger, and H. Jansen, "Growth hormone restores hepatic lipase mRNA levels but the translation is impaired in hepatocytes of hypothyroid rats.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1345, no. 2, pp. 172–9, Apr. 1997.

[290] J. Kotzka, B. Knebel, H. Avci, S. Jacob, U. Nitzgen, F. Jockenho-

vel, J. Heeren, J. Haas, and D. Muller-Wieland, "Phosphorylation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a links growth hormone action to lipid metabolism in hepatocytes.," *Atherosclerosis*, vol. 213, no. 1, pp. 156–65, Nov. 2010.

[291] Y. Fan, R. K. Menon, P. Cohen, D. Hwang, T. Clemens, D. J. DiGirolamo, J. J. Kopchick, D. Le Roith, M. Trucco, and M. a Sperling, "Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 30, pp. 19937–44, Jul. 2009.

[292] B. C. Sos, C. Harris, S. M. Nordstrom, J. L. Tran, M. Balázs, P. Caplazi, M. Febbraio, M. A. B. Applegate, K. Wagner, and E. J. Weiss, "Abrogation of growth hormone secretion rescues fatty liver in mice with hepatocyte-specific deletion of JAK2.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 121, no. 4, pp. 1412–23, Apr. 2011.

[293] Y. Jiang, J. Jin, P. Iakova, J. C. Hernandez, N. Jawanmardi, E. Sullivan, G. L. Guo, N. a Timchenko, and G. J. Darlington, "Farnesoid X receptor directly regulates xenobiotic detoxification genes in the long-lived Little mice.," *Mechanisms of ageing and development*, vol. 134, no. 9, pp. 407–15, Sep. 2013.

[294] P. U. Freda, W. Shen, S. B. Heymsfield, C. M. Reyes-Vidal, E. B. Geer, J. N. Bruce, and D. Gallagher, "Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor I excess due to acromegaly.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 93, no. 6, pp. 2334–43, Jun. 2008.

[295] J. S. Samra, M. L. Clark, S. M. Humphreys, I. A. MacDonald, P. A. Bannister, D. R. Matthews, and K. N. Frayn, "Suppression of the nocturnal rise in growth hormone reduces subsequent lipolysis in subcutaneous adipose tissue.," *European journal of clinical investigation*, vol. 29, no. 12, pp. 1045–52, Dec. 1999.

[296] T. Johansen, B. Richelsen, H. S. Hansen, N. Din, and K. Malmlöf, "Growth hormone-mediated breakdown of body fat : effects of GH on lipases in adipose tissue and skeletal muscle of old rats fed different diets.," *Hormone and metabolic research*, vol. 35, no. 4, pp. 243–50, Apr. 2003.

[297] B. Kelder, D. E. Berryman, R. Clark, A. Li, E. O. List, and J. J. Kopchick, "CIDE-A gene expression is decreased in white adipose tissue of growth hormone receptor/binding protein gene disrupted mice and with high-fat feeding of normal mice.," *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, vol. 17, no. 4, pp. 346–51, Aug. 2007.

[298] J. T. Zhao, M. J. Cowley, P. Lee, V. Birzniece, W. Kaplan, and K. K. Y. Ho, "Identification of novel GH-regulated pathway of lipid metabolism in

adipose tissue : a gene expression study in hypopituitary men.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 96, no. 7, pp. E1188–96, Jul. 2011.

[299] J. Oscarsson, M. Ottosson, K. Vikman-Adolfsson, F. Frick, S. Enerbäck, H. Lithell, and S. Edén, "GH but not IGF-I or insulin increases lipoprotein lipase activity in muscle tissues of hypophysectomised rats.," *The Journal of endocrinology*, vol. 160, no. 2, pp. 247–55, Feb. 1999.

[300] Y. Khalfallah, G. Sassolas, F. Borson-Chazot, N. Vega, and H. Vidal, "Expression of insulin target genes in skeletal muscle and adipose tissue in adult patients with growth hormone deficiency : effect of one year recombinant human growth hormone therapy.," *The Journal of endocrinology*, vol. 171, no. 2, pp. 285–92, Nov. 2001.

[301] R. Trepp, M. Flu, C. Stettler, C. Boesch, M. Ith, R. Kreis, H. Hoppeler, H. Howald, J. Schmid, P. Diem, E. R. Christ, H. Hoppeler, H. Howald, S. J-p, P. Diem, and C. Er, "Effect of GH on human skeletal muscle lipid metabolism in GH deficiency," *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, vol. 294, pp. 1127–1134, 2008.

[302] E. W. A. Ehrenborg and A. Krook, "Regulation of Skeletal Muscle Physiology and Metabolism by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta," *Pharmacological Review*, vol. 61, no. 3, pp. 373–393, 2009.

[303] J. Szendroedi, E. Zwartler, A. I. Schmid, M. Chmelik, G. Pacini, G. Kacerovsky, G. Smekal, P. Nowotny, O. Wagner, C. Schnack, G. Schernthaner, K. Klaushofer, and M. Roden, "Reduced basal ATP synthetic flux of skeletal muscle in patients with previous acromegaly.," *PloS one*, vol. 3, no. 12, p. e3958, Jan. 2008.

[304] D. B. Cater, B. E. Holmes, and L. K. Mee, "The effect of growth hormone upon cell division and nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the rat.," *The Biochemical journal*, vol. 66, no. 3, pp. 482–6, Jul. 1957.

[305] S. Ekberg, M. Luther, T. Nakamura, and J. O. Jansson, "Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy.," *The Journal of endocrinology*, vol. 135, no. 1, pp. 59–67, Oct. 1992.

[306] P. a Pennisi, J. J. Kopchick, S. Thorgeirsson, D. LeRoith, and S. Yakar, "Role of growth hormone (GH) in liver regeneration.," *Endocrinology*, vol. 145, no. 10, pp. 4748–55, Oct. 2004.

[307] G. D. Cartee, E. E. Bohn, B. T. Gibson, and R. P. Farrar, "Growth hormone supplementation increases skeletal muscle mass of old male Fischer 344/brown Norway rats.," *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, vol. 51, no. 3, pp. B214–9, May 1996.

[308] D. Rudman, A. Feller, H. Nagraj, G. Gergans, P. Lalitha, A. Gold-

berg, and R. Schlenker, "Effets of Human Growth Hormone in Men over 60 years Old," *The New England journal of medicine*, vol. 323, pp. 1–6, 1990.

[309] K. Krupczak-Hollis, X. Wang, M. B. Dennewitz, and R. H. Costa, "Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through forkhead box m1b.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 38, no. 6, pp. 1552–62, Dec. 2003.

[310] J. Jin, G.-L. Wang, X. Shi, G. J. Darlington, and N. a Timchenko, "The age-associated decline of glycogen synthase kinase 3beta plays a critical role in the inhibition of liver regeneration.," *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 14, pp. 3867–80, Jul. 2009.

[311] W. Huang, K. Ma, J. Zhang, M. Qatanani, J. Cuvillier, J. Liu, B. Dong, X. Huang, and D. D. Moore, "Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 312, no. 5771, pp. 233–6, Apr. 2006.

[312] M. Rudling, P. Parini, and B. Angelin, "Growth hormone and bile acid synthesis. Key role for the activity of hepatic microsomal cholesterol 7alpha-hydroxylase in the rat.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 99, no. 9, pp. 2239–45, May 1997.

[313] J.-O. Jansson, S. Ekberg, S. B. Hoath, W. G. Beamer, and L. A. Frohman, "Growth Hormone Enhances Hepatic Epidermal Growth Factor Receptor Concentration in Mice," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 82, no. December, pp. 1871–1876, 1988.

[314] S. Johansson, B. Husman, G. Norstedt, and G. Andersson, "Growth hormone regulates the rodent hepatic epidermal growth factor receptor at a pretranslational level.," *Journal of molecular endocrinology*, vol. 3, no. 2, pp. 113–20, Sep. 1989.

[315] J. G. Miquet, L. González, M. N. Matos, C. E. Hansen, A. Louis, A. Bartke, D. Turyn, and A. I. Sotelo, "Transgenic mice overexpressing GH exhibit hepatic upregulation of GH-signaling mediators involved in cell proliferation.," *The Journal of endocrinology*, vol. 198, no. 2, pp. 317–30, Aug. 2008.

[316] L. González, M. E. Díaz, J. G. Miquet, A. I. Sotelo, D. Fernández, F. P. Dominici, A. Bartke, and D. Turyn, "GH modulates hepatic epidermal growth factor signaling in the mouse.," *The Journal of endocrinology*, vol. 204, no. 3, pp. 299–309, Mar. 2010.

[317] T. Yamauchi, K. Ueki, K. Tobe, H. Tamemoto, N. Sekine, M. Wada, M. Honjo, M. Takahashi, T. Takahashi, H. Hirai, T. Tushima, Y. Akanuma, T. Fujita, I. Komuro, Y. Yazaki, and T. Kadowaki, "Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone.," *Nature*, vol. 390, no. 6655, pp. 91–6, Nov. 1997.

[318] T. Yamauchi, K. Ueki, K. Tobe, H. Tamemoto, N. Sekine, M. Wada,

M. Honjo, M. Takahashi, T. Takahashi, H. Hirai, T. Tsushima, Y. Akanuma, T. Fujita, I. Komuro, Y. Yazaki, and T. Kadowaki, "Growth hormone-induced tyrosine phosphorylation of EGF receptor as an essential element leading to MAP kinase activation and gene expression.," *Endocrine journal*, vol. 45 Suppl, pp. S27–31, Apr. 1998.

[319] Y. Huang, Y. Chang, X. Wang, J. Jiang, and S. J. Frank, "Growth hormone alters epidermal growth factor receptor binding affinity via activation of extracellular signal-regulated kinases in 3T3-F442A cells.," *Endocrinology*, vol. 145, no. 7, pp. 3297–306, Jul. 2004.

[320] L. Blaas, J.-W. Kornfeld, D. Schramek, M. Musteanu, G. Zollner, J. Gumhold, F. van Zijl, D. Schneller, H. Esterbauer, G. Egger, M. Mair, L. Kenner, W. Mikulits, R. Eferl, R. Moriggl, J. Penninger, M. Trauner, and E. Casanova, "Disruption of the growth hormone-signal transducer and activator of transcription 5-insulinlike growth factor 1 axis severely aggravates liver fibrosis in a mouse model of cholestasis.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 51, no. 4, pp. 1319–26, Apr. 2010.

[321] Z. Laron, S. Ginsberg, and M. Webb, "Nonalcoholic fatty liver in patients with Laron syndrome and GH gene deletion - preliminary report.," *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, vol. 18, no. 5, pp. 434–8, Oct. 2008.

[322] H. Kaji, T. Sakurai, G. Iguchi, M. Murata, M. Kishimoto, S. Yoshioka, K. Iida, Y. Okimura, and K. Chihara, "Adult Growth Hormone Deficiency in Japan : Results of Investigation by Questionnaire," *Endocrine Journal*, vol. 49, no. 6, pp. 597–604, 2002.

[323] T. Ichikawa, K. Hamasaki, H. Ishikawa, E. Ejima, K. Eguchi, and K. Nakao, "Non-alcoholic steatohepatitis and hepatic steatosis in patients with adult onset growth hormone deficiency," *Gut*, vol. 52, no. 6, pp. 912–3, Jun. 2003.

[324] L. a Adams, A. Feldstein, K. D. Lindor, and P. Angulo, "Nonalcoholic fatty liver disease among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 39, no. 4, pp. 909–14, Apr. 2004.

[325] J. D. Veldhuis, A. Weltman, R. Abbott, T. Mulligan, M. L. Johnson, S. F. Pincus, M. Straume, C. Hill, N. Carolina, and H. H. Mcguire, "Impact of Age, Sex Steroid Hormones, and Obesity on Basal Versus Pulsatile Growth Hormone Secretion in Men Assessed in an Ultrasensitive Chemiluminescence Assay," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 80, no. 11, pp. 3209–3222, 1995.

[326] H. Langendink, Janneke G Meinders, A. Edo Burggraaf, Jacobus Frölich, Marijke Roelen, Corné A. Schoemaker, Rik C. Cohen, Adam F. Pijl,

“Influence of obesity and body fat distribution on growth hormone kinetics in humans,” *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, vol. 277, pp. E824–E829, 1999.

[327] A. S. Cornford, A. L. Barkan, and J. F. Horowitz, “Rapid suppression of growth hormone concentration by overeating : potential mediation by hyperinsulinemia,” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 96, no. 3, pp. 824–30, Mar. 2011.

[328] L. Xu, C. Xu, C. Yu, M. Miao, X. Zhang, Z. Zhu, X. Ding, and Y. Li, “Association between serum growth hormone levels and nonalcoholic fatty liver disease : a cross-sectional study,” *PloS one*, vol. 7, no. 8, p. e44136, Jan. 2012.

[329] E. Koehler, J. Swain, S. Sanderson, A. Krishnan, K. Watt, and M. Charlton, “Growth hormone, dehydroepiandrosterone and adiponectin levels in non-alcoholic steatohepatitis : an endocrine signature for advanced fibrosis in obese patients,” *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 32, no. 2, pp. 279–86, Feb. 2012.

[330] T. Ichikawa, K. Nakao, K. Hamasaki, R. Furukawa, S. Tsuruta, Y. Ueda, N. Taura, H. Shibata, M. Fujimoto, K. Toriyama, and K. Eguchi, “Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease,” *Hepatology international*, vol. 1, no. 2, pp. 287–94, Jun. 2007.

[331] F. Arturi, E. Succurro, C. Procopio, E. Pedace, G. C. Mannino, M. Lugarà, T. Procopio, F. Andreozzi, A. Sciacqua, M. L. Hribal, F. Perticone, and G. Sesti, “Nonalcoholic fatty liver disease is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor-I,” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 96, no. 10, pp. E1640–4, Oct. 2011.

[332] K. C. Mekala and N. a Tritos, “Effects of recombinant human growth hormone therapy in obesity in adults : a meta analysis,” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 94, no. 1, pp. 130–7, Jan. 2009.

[333] L. Zhang, Y. Zhou, A. Y. Zhu, X. Li, S. S. Mundt, L. Gao, J. Lisnock, M. Hernandez, M. Alonso-Galicia, M. S. Springer, E. a O’Neill, B. L. Daugherty, and O. Puig, “Metabolic syndrome in mice induced by expressing a transcriptional activator in adipose tissue,” *Transgenic research*, vol. 21, no. 3, pp. 633–44, Jun. 2012.

[334] K. Saso, G. Moehren, K. Higashi, and J. B. Hoek, “Differential inhibition of epidermal growth factor signaling pathways in rat hepatocytes by long-term ethanol treatment,” *Gastroenterology*, vol. 112, no. 6, pp. 2073–88, Jun. 1997.

[335] B. H. Zhang and G. C. Farrell, “Chronic ethanol consumption disrupts complexation between EGF receptor and phospholipase C-gamma1 : relevance to impaired hepatocyte proliferation,” *Biochemical and biophysical*

research communications, vol. 257, no. 1, pp. 89–94, Apr. 1999.

[336] V. Crljen, D. Visnjić, and H. Banfić, “Presence of different phospholipase C isoforms in the nucleus and their activation during compensatory liver growth,” *FEBS letters*, vol. 571, no. 1–3, pp. 35–42, Jul. 2004.

[337] M. H. Rasmussen, “Obesity, growth hormone and weight loss,” *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 316, no. 2, pp. 147–53, Mar. 2010.

[338] J. L. Clasey, a Weltman, J. Patrie, J. Y. Weltman, S. Pezzoli, C. Bouchard, M. O. Thorner, and M. L. Hartman, “Abdominal visceral fat and fasting insulin are important predictors of 24-hour GH release independent of age, gender, and other physiological factors,” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 86, no. 8, pp. 3845–52, Aug. 2001.

[339] F. Cordido, A. Peñalva, C. Dieguez, and F. F. Casanueva, “Massive growth hormone (GH) discharge in obese subjects after the combined administration of GH-releasing hormone and GHRP-6 : evidence for a marked somatotroph secretory capability in obesity,” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 76, no. 4, pp. 819–23, Apr. 1993.

[340] A. Natarajan, B. Wagner, and M. Sibilia, “The EGF receptor is required for efficient liver regeneration,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 43, pp. 17081–6, Oct. 2007.

[341] S. Paranjpe, W. C. Bowen, G. C. Tseng, J.-H. Luo, A. Orr, and G. K. Michalopoulos, “RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats,” *The American journal of pathology*, vol. 176, no. 6, pp. 2669–81, Jun. 2010.

[342] A. Zerrad-Saadi, M. Lambert-Blot, C. Mitchell, H. Bretes, A. Collin de l’Hortet, V. Baud, F. Chereau, A. Sotiropoulos, J. J. Kopchick, L. Liao, J. Xu, H. Gilgenkrantz, and J.-E. Guidotti, “GH receptor plays a major role in liver regeneration through the control of EGFR and ERK1/2 activation,” *Endocrinology*, vol. 152, no. 7, pp. 2731–41, Jul. 2011.

[343] K. L. Gatford, A. R. Egan, I. J. Clarke, and P. C. Owens, “Sexual dimorphism of the somatotrophic axis,” *The Journal of endocrinology*, vol. 157, no. 3, pp. 373–89, Jun. 1998.

[344] M. L. Chaisson, J. T. Brooling, W. Ladiges, S. Tsai, and N. Fausto, “Hepatocyte-specific inhibition of NF- κ B leads to apoptosis after TNF treatment , but not after partial hepatectomy,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 2, pp. 193–202, 2002.

[345] J. Vaquero, J. S. Campbell, J. Haque, R. S. McMahan, K. J. Riehle, R. L. Bauer, and N. Fausto, “Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88 provide mechanistic insights into the cause and effects of interleukin-6 activation in mouse liver regeneration,” *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 54, no. 2, pp. 597–608, Aug. 2011.

[346] J. M. Harkins, N. Moustaid-Moussa, Y.-J. Chung, K. M. Penner, J. J. Pestka, C. M. North, and K. J. Claycombe, "Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice.," *The Journal of nutrition*, vol. 134, no. 10, pp. 2673–7, Oct. 2004.

[347] K. Yamaguchi, Y. Itoh, C. Yokomizo, T. Nishimura, T. Niimi, H. Fujii, T. Okanoue, and T. Yoshikawa, "Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice.," *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology*, vol. 90, no. 8, pp. 1169–78, Aug. 2010.

[348] S. Haga, W. Ogawa, H. Inoue, K. Terui, T. Ogino, R. Igarashi, K. Takeda, S. Akira, S. Enosawa, H. Furukawa, S. Todo, and M. Ozaki, "Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice.," *Journal of hepatology*, vol. 43, no. 5, pp. 799–807, Nov. 2005.

[349] A. Moh, Y. Iwamoto, G.-X. Chai, S. S.-M. Zhang, A. Kano, D. D. Yang, W. Zhang, J. Wang, J. J. Jacoby, B. Gao, R. a Flavell, and X.-Y. Fu, "Role of STAT3 in liver regeneration : survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery.," *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology*, vol. 87, no. 10, pp. 1018–28, Oct. 2007.

[350] Z. Wenn, K. Chen, and E. Darnell, "Epidermal Growth Factor and Lipopolysaccharide Activate Stat3 Transcription Factor in Mouse Liver", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 35, pp. 21933–21935, 1994.

[351] A. Kamat, P. M. Ghosh, R. L. Glover, B. Zhu, C. Yeh, G. G. Choudhury, and M. S. Katz, "Reduced Expression of Epidermal Growth Factor Receptors in Rat Liver During Aging," *Journal of Gerontology : Biological Sciences*, vol. 63, no. 7, pp. 683–692, 2008.

[352] A. L. Mencalha, R. Binato, G. M. Ferreira, B. Du Rocher, and E. Abdelhay, "Forkhead Box M1 (FoxM1) Gene Is a New STAT3 Transcriptional Factor Target and Is Essential for Proliferation, Survival and DNA Repair of K562 Cell Line," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, p. e48160, Oct. 2012.

[353] C. Rendenbach, S. Ganswindt, S. Seitz, F. Barvencik, a K. Huebner, a Baranowsky, T. Streichert, a Niemeier, J. Heeren, M. Amling, a Bartelt, and T. Schinke, "Increased expression of transthyretin in leptin-deficient ob/ob mice is not causative for their major phenotypic abnormalities.," *Journal of neuroendocrinology*, vol. 25, no. 1, pp. 14–22, Jan. 2013.

[354] Y. Takahashi, K. Iida, K. Takahashi, S. Yoshioka, H. Fukuoka, R. Takeno, M. Imanaka, H. Nishizawa, M. Takahashi, Y. Seo, Y. Hayashi, T. Kondo, Y. Okimura, H. Kaji, R. Kitazawa, S. Kitazawa, and K. Chihara, "Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency.," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 3, pp.

938–43, Mar. 2007.

[355] S. Jain, N. Desai, and A. Bhangoo, “Pathophysiology of GHRH-growth hormone-IGF1 axis in HIV/AIDS.,” *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, vol. 14, no. 2, pp. 113–8, Jun. 2013.

[356] C. Concepts and H. B. El-serag, “Hepatocellular Carcinoma,” *The New England journal of medicine*, vol. 365, pp. 1118–1127, 2011.

[357] C. Berasain, J. Castillo, J. Prieto, and M. a Avila, “New molecular targets for hepatocellular carcinoma : the ErbB1 signaling system.,” *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 27, no. 2, pp. 174–85, Mar. 2007.

[358] E. Schiffer, C. Housset, W. Cacheux, D. Wendum, C. Desbois-Mouthon, C. Rey, F. Clergue, R. Poupon, V. Barbu, and O. Rosmorduc, “Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis.,” *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 41, no. 2, pp. 307–14, Feb. 2005.

[359] S. H. Caldwell, D. M. Crespo, H. S. Kang, and A. M. S. Al-Osaimi, “Obesity and hepatocellular carcinoma,” *Gastroenterology*, vol. 127, no. 5, pp. S97–S103, Nov. 2004.

[360] C. Berasain, M. J. Perugorria, M. U. Latasa, J. Castillo, S. Goñi, M. Santamaría, J. Prieto, and M. a Avila, “The epidermal growth factor receptor : a link between inflammation and liver cancer.,” *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 234, no. 7, pp. 713–25, Jul. 2009.

[361] H. Kalthoff, C. Roeder, M. Brockhaus, H. G. Thiele, and W. Schmieg, “Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 4, pp. 2762–6, Feb. 1993.

[362] J. Yoo, C. E. Rodriguez Perez, W. Nie, R. a Edwards, J. Sinnett-Smith, and E. Rozengurt, “TNF- α induces upregulation of EGFR expression and signaling in human colonic myofibroblasts.,” *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 302, no. 8, pp. G805–14, Apr. 2012.

[363] X. Tan, U. Apte, A. Micsenyi, E. Kotsagrellos, J.-H. Luo, S. Ranganathan, D. K. Monga, A. Bell, G. K. Michalopoulos, and S. P. S. Monga, “Epidermal Growth Factor Receptor : A Novel Target of the Wnt/ β - Catenin Pathway in Liver,” *Gastroenterology*, vol. 129, no. 1, pp. 285–302, 2007.

[364] P. Laurent-Puig and J. Zucman-Rossi, “Genetics of hepatocellular tumors,” *Oncogene*, vol. 25, pp. 3778–3786, 2006.

[365] T. C. He, S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, “A simplified system for generating recombinant adenoviruses.,”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, no. 5, pp. 2509–14, Mar. 1998.

[366] A. de Biomédecine, “Greffe hépatique Résumé de l ’ activité,” 2011. [Online]. Available : [http ://www.agence-biomedecine.fr/](http://www.agence-biomedecine.fr/)

Quatrième partie

ANNEXES

Vous trouverez en annexe de ce manuscrit un protocole facilitant la lecture des résultats complémentaires, ainsi que deux revues de la littérature :

1. Protocole de construction et d'amplification des vecteurs adénoviraux

2. Une revue de la littérature s'intéressant à la régénération hépatique, que nous avons écrite avec ma directrice de thèse Hélène Gilgenkrantz.

« H. Gilgenkrantz and **A. Collin de l'Hortet**, "*New insights into liver regeneration.*," **Clinics and research in hepatology and gastroenterology**, May 2011 »

3. Une seconde revue de la littérature se concentrant sur la voie de signalisation EGFR, que nous avons écrite conjointement avec ma directrice de thèse Hélène Gilgenkrantz ainsi que mon encadrant de thèse Jacques-Emmanuel Guidotti.

« **A. Collin de l'Hortet**, H. Gilgenkrantz, and J.-E. Guidotti, "*EGFR : A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration.*," **International journal of hepatology**, vol. 2012, p. 476910, Jan. 2012. »

Protocole de construction et d'amplification des vecteurs adénoviraux

Pour construire le vecteur adénoviral pour l'EGFR, nous avons suivi un protocole décrit précédemment [365] et résumé dans la Figure 9.1.

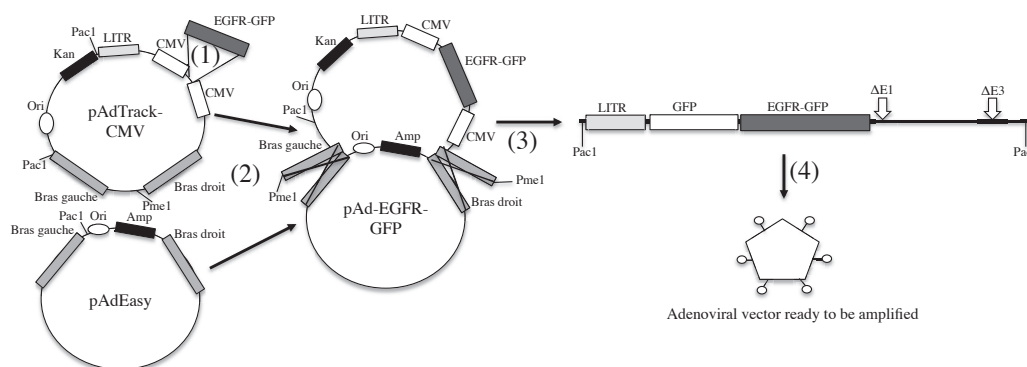


FIGURE 9.1 – Construction du vecteur adénoviral EGFR. Quatre étapes aboutissent au vecteur adénoviral EGFR : (1) clonage du plasmide EGFR dans l'Ad-Track. (2) Co-transfection de l'AdTrack et l'AdEasy pour recombinaison homologue. (3) Linéarisation de l'Ad-EGFR-GFP. (4) Transfection dans des cellules 293, puis production

1- Grâce à *Carmen Berasain*, nous avons obtenu un plasmide contenant la séquence EGFR, que nous avons **cloné dans un plasmide « pAdTrack »**.

2- Après linéarisation de ce plasmide par l'enzyme PmeI, nous l'avons **co-transformé avec le plasmide adénoviral « pAdEasy »** (dont les régions E1 et E3 sont délétées) dans des bactéries BJ5183 afin de permettre la recombinaison homologue entre les deux plasmides. Les plasmides correctement recombinés ont ensuite été sélectionnés par la kanamycine.


3- Ce nouveau plasmide a été **linéarisé par PacI** pour libérer la séquence d'intérêt contenant en particulier l'EGFR et les régions déficientes E1 et E3 nécessaire à la réplication.

4- La séquence a ensuite été **transfctée dans des cellules 293**, transcomplémentantes pour les régions E1 et E3 (absentes du plasmide) (Figure 22). *Ce système permet alors la production de particules adénovirales infectieuses (déficiente pour la réplication), qui forment alors des plaques de lyse*

et permettent la constitution d'un pré-stock.

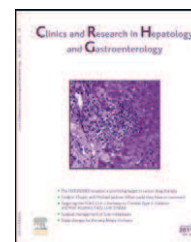
Ce pré-stock, ainsi que ceux des vecteurs adénoviraux pour Stat5 et les différents contrôles (obtenus respectivement par *Peter Rotwein* et *Sylvie Fabrega*) ont été utilisés pour infecter un grand nombre de cellules 293 et obtenir des **stocks de particules virales de haut titre** (supérieure à 10^{10} pi/ml).



Available online at
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com/en



MINI REVIEW

New insights into liver regeneration

H. Gilgenkrantz*, A. Collin de l'Hortet

*U.1016 Inserm, CNRS UMR8104, institut Cochin, university Paris-Descartes, 24,
rue du Faubourg-Saint-Jacques, Paris 75014, France*

Summary Even if the Greeks probably anticipated rather than discovered the extraordinary regenerative capacity of the liver with the Prometheus myth, this phenomenon still fascinates scientists nowadays with the same enthusiasm. There are good reasons to decipher this process other than to find an answer to our fantasy of immortality: it could indeed help patients needing large liver resections or living-donor liver transplantation, it could increase our understanding of liver pathology and finally it could enable novel cell-therapy approaches. For decades, most of our knowledge about the mechanisms involved in liver regeneration came from the classic two-thirds partial hepatectomy (PH) model. In this scenario, hepatocytes play the leading role, which raises the question of the simple existence of a stem cell population. Recently however, hepatic progenitor cells come again under the limelight, seeming to play a role in liver physiology and in various liver diseases such as steatosis or cirrhosis. Excellent reviews have recently addressed liver regeneration. Our goal is therefore to focus on recent improvements in the field, highlighting data mostly published in the last two years in order to draw a putative picture of what the future research axes on liver regeneration might look like.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Liver regeneration after partial hepatectomy (PH): and the winner is... the hepatocyte!

After a two-thirds partial hepatectomy (PH) in rodents, the remnant liver lobes will compensate for lost tissue and recover the initial liver mass in less than two weeks [1]. In studying this model, the first surprise came from the discovery that near all hepatocytes, which are quiescent and differentiated cells in the adult resting liver, are the

first cells to re-enter the cell cycle rapidly after PH [2]. Serial transplantation experiments in rodents have shown that adult hepatocytes have a near infinite capacity to proliferate in vivo [3]. No need for a stem cell pool in these conditions! It has been first suggested that proliferating hepatocytes, in the resting liver [4] as in regenerating conditions [5], migrate from the portal space to the perivenous region. This "streaming liver" hypothesis has then been discarded [6,7] but is now currently being re-examined with the help of recent lineage studies that will be discussed below.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 44 41 24 72;
fax: +33 1 44 41 24 21.

E-mail address: helene.gilgenkrantz@inserm.fr
(H. Gilgenkrantz).

Ask for the program!

The search for the spark that initiates hepatocyte proliferation and ignites all the downstream cascades has been

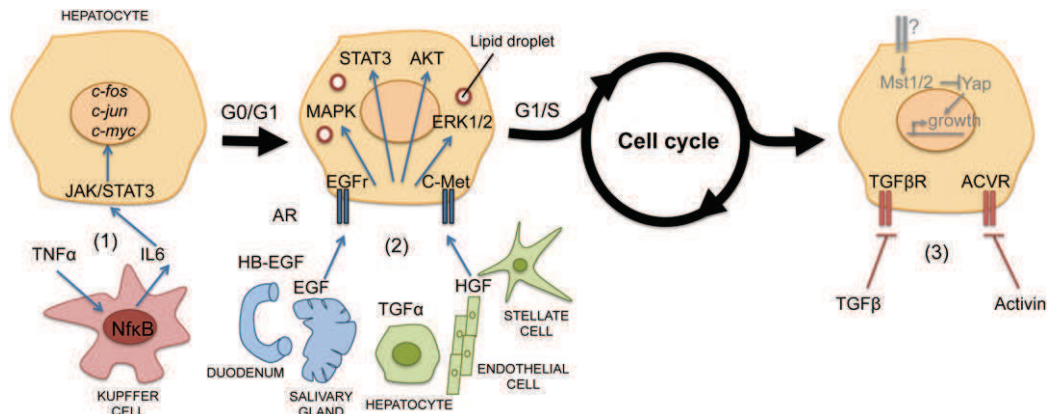


Figure 1 The main steps of liver regeneration after partial hepatectomy (PH). (1) "Priming" phase: this initial step involves cytokines pathways interactions between hepatocytes and non-parenchymal cells: as a result of $\text{TNF-}\alpha$ secretion, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ becomes activated in Kupffer cells leading ultimately to STAT3 expression in hepatocytes via the upregulation of IL-6. STAT3 pathway will then induce transcription of early genes in hepatocytes, such as *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, promoting the G0/G1 transition. (2) Metabolic and growth factors phase: metabolic changes in the liver are notably illustrated by a transient lipid droplet accumulation inside hepatocytes. Simultaneously, growth factors coming from different tissues are expressed, including Amphiregulin (AR), HB-EGF, EGF, $\text{TGF}\alpha$ and HGF binding to their cognate receptors on hepatocytes (respectively EGFR and C-Met). Eventually, this leads to the activation of multiple pathways such as MAPK, STAT3, PI3K/Akt and ERK1/2 involved in liver regeneration to allow cell cycle progression. (3) Termination phase: once liver regeneration is achieved, stop signals are expected to suppress proliferation. Proteins from the TGF- β family display growth inhibitory effects on hepatocytes. More recently, the Mst1/2 has been proposed to be involved in the end of liver regeneration in inhibiting Yap activation.

a Holy Graal quest: lipopolysaccharide (LPS), the ligand of myeloid differentiation factor 88 (Myd88) [8] or serotonin [9] were among the numerous prospective candidates. However, nature has probably chosen redundancy to cover its tracks precluding the discovery of a unique gene! Thus, besides a few exceptions, the invalidation of a single gene delays rather than impairs the restoration of liver mass. Schematically, one can distinguish three steps that are tightly orchestrated to allow liver regeneration completion. The first phase, called the "priming phase", occurs in the first hours after PH and poises the hepatocytes to enter G1 phase and to become receptive to growth factors [10]. The expression of more than a hundred genes is induced in the first minutes to the first hours after PH, the invalidation of which often leads to a delay in regeneration [11,12]. The priming phase requires the secretion of cytokines such as $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6, leading finally to the activation of the STAT3 pathway within the hepatocytes (Fig. 1).

The second phase corresponds to an increased metabolic demand imposed on the remnant liver. During this phase, among other metabolic changes, a transient hypoglycemia is suggested to induce systemic lipolysis followed by a lipid droplets accumulation in the hepatocytes [13] whose importance for proliferation is discussed [14,15]. Concomitantly, two main growth factors receptors, namely epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-Met will be activated, stimulating the progression of hepatocytes through the cell cycle. It seems that EGFR and c-Met have unique and potentially overlapping functions. EGFR down-regulation induces a delayed and reduced hepatocyte proliferation most likely due to a defect in G1/S progression [16] with a compensatory activation of other ErbB receptors and c-Met [17]. Loss of c-Met signalling in hepatocytes also decreases liver regeneration potential but this receptor seems to regulate

G2/M progression through a persistent extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation [18]. Both EGFR and c-Met will then recruit scaffolding proteins and activate multiple intracellular intertwined networks, among which MAPK, STAT3, PI3K/Akt and ERK1/2 are the most important for liver regeneration. Beta-catenin pathway is also activated during G1/S transition, $\text{TGF-}\alpha$ being a direct target of beta-catenin signalling [19]. Crosstalks between these molecular pathways do not help with data interpretation. Hepatocyte specific deletion of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), a negative regulator of STAT3, induces the enhancement of DNA replication after PH [20] with an activation of the ERK1/2 pathway. In contrast, liver specific STAT3-KO fails to impact liver regeneration, because of an increased cell size probably due to the compensatory activation of Akt/mTOR pathway [21]. While rapamycin, an inhibitor of mTOR, inhibits DNA replication after PH [22], the activation of PI3K/PDK1/Akt pathway was involved in hepatocyte cell size rather than in hepatocyte proliferation [23]. Further characterization of the role of each protein downstream of PDK1/mTOR pathway will surely help in the understanding of the balance between hepatocyte proliferation and cell growth.

The last and much less studied step is the termination of liver regeneration. Members of the Transforming growth factor β (TGF- β) superfamily are known to be involved in this step. However, the hyperproliferative answer in mice lacking TGF- β receptor II is only transient and does not induce liver overgrowth. The compensatory activity of activin A in this context suggests that activin and TGF- β collaborate to stop liver growth [24,25]. However, as discussed in the second part of this review, TGF- β signalling pathway also plays a role in the expansion of the progenitor cell compartment [26].

Cellular actors: immune and endothelial cells come on stage!

Several data underlined the critical importance of cell types other than hepatocytes such as macrophages, hepatic stellate cells and lymphocytes for the initiation of liver regeneration [27,28]. The transfer of splenocytes from wild-type mice but not lymphotoxin-deficient mice improved liver regeneration in T cell-deficient mice [29], suggesting that the adaptive immune system positively regulates liver regeneration. Therefore, a pharmacological stimulation of lymphotoxin beta-receptor might represent a novel therapeutic approach to improve liver regeneration. Conversely, the depletion of natural Killer cells (NK) that are activated after PH enhances liver regeneration, indicating that the activation of the innate immunity negatively regulates liver regeneration [30]. The role of NKT cells seems more complex. Their activation accelerates liver regeneration after PH [31] but is also correlated with an impaired liver regeneration in a mouse model of human hepatitis B infection [32].

Interesting novel data came from endothelial cells that are yet the last to enter the cell cycle after PH. Of course, their importance in liver ontogeny already suggested that they might also be involved in liver regeneration [33], but the demonstration was still pending. An elegant recent paper showed that liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) represent a phenotypically unique population, which initiates and sustains liver regeneration through the release of angiocrine trophogens such as HGF and Wnt2 [34]. A mathematical model in which the dynamics of individual hepatocytes and blood vessels is simulated on a computer has corroborated the role of LSECs in the orchestration of a normal architecture recovery after a carbon tetrachloride liver injury. According to this model, the newly formed hepatocytes align themselves along the nearest sinusoids, [35], underlining the importance of a direct cellular contact between LSECs and hepatocytes for proliferation. Finally, an inducible deletion of the RBP-J Notch signalling regulator comforted the crucial role of the endothelium for liver regeneration. Notch signalling is known to be required for regeneration of the liver vasculature. In the mutant model, an abnormal arrangement of liver sinusoids was observed after PH and the proliferation of LSECs was impaired. These modifications were correlated with a reduced hepatocyte proliferation and an increase in hepatocyte apoptosis [36]. Endothelial cells will thus have to be taken into account in novel cell therapy approaches.

When the curtain falls

Recently, a very interesting pathway involved in the regulation of drosophila organ size was identified as potentially important for the termination of liver regeneration: the Hippo (Mst1/2 in mammals)/YAP pathway [37]. This network includes a cascade of kinases monitoring cell-cell contact and polarity in drosophila, which has equivalent conserved orthologous genes in mammals. When Mst1/2 is selectively inactivated in a mouse liver, it induces the activation of the downstream YAP kinase leading to hepatocyte entry into the cell cycle and, consequently, to a massive liver

overgrowth [38,39]. Mst1/2 pathway is thus considered as a gatekeeper for the overall liver size. A kinetic study of post PH regeneration of invalidated animals for Mst1/2 will bring the definitive argument for the role of this pathway in regeneration termination.

A liver-specific ablation of integrin-linked kinase, which is an extracellular matrix-adhesion component, induces a termination defect of liver regeneration resulting in a significant larger liver than before PH [40]. Interestingly, these mutant mice show a higher YAP expression during liver regeneration, suggesting that integrin signalling, through cell-cell contact and extracellular matrix modulation could control the Hippo kinase pathway and the termination of the liver regeneration process. The puzzle of the interconnections between Wnt/beta-catenin-Hippo cascade- and EGFR pathways will surely be the subject of future studies.

MicroRNAs hide from backstage

As microRNAs constitute a new class of regulators orchestrating proliferation and cancer, one can legitimately speculate about their role in liver regeneration. Only a few studies have yet addressed this question. Besides presenting cell proliferation and apoptosis, young mice lacking Dicer1 in adult hepatocytes are otherwise minimally affected [41]. With ageing however, mutant mice show a moderate ductular reaction with an increasing degree of inflammation and necrosis. Since the most highly up-regulated gene in Dicer1^{-/-} mice is alpha-fetoprotein, it is hypothesized that the increased proliferation seen in these mice is due to cells reverting to hepatoblast-like state. Interestingly, a striking number of imprinted genes are up-regulated in the absence of Dicer1 activity in the liver. Mice with hepatocyte-specific inactivation of DGCR8, which is required for microRNA biogenesis, have also been generated. They develop normally after adulthood but their hepatocytes failed to transition into S phase after PH. However, a subset of mice shows compensatory expansion of adult liver progenitor cells that have retained DGCR8 and therefore miRNA expression [42]. A global analysis of miRNA expression during the first 36 hours after PH identified miR-21 as one of the seven most induced miRNAs after PH. The authors suggest that miR-21 antagonizes Btg2, a gene restraining G1 to S transition phase, thus facilitating efficient cell cycle progression [42]. There is no doubt that numerous future publications will deal with the role of miRNAs in liver regeneration and in the modulation of the progenitor cell compartment.

Liver regeneration in other conditions: here come progenitor cells!

Oval cells, small hepatocyte progenitor cells, intermediate hepatobiliary cells: different facets for a same character?

In the fifties, Opie and Farber described a category of small hepatic cells that they called oval cells, emerging from the canal of Hering, where bile canaliculi connect with bile ducts. Since then, it has become a hackneyed term used to define a highly heterogeneous population of cells whose fate

is classically bipotent giving rise to both hepatocytes and cholangiocytes at least *in vitro* and at least in rodents. The search for oval cells origin led to propose that mesenchymal or stellate cells can be converted to hepatocyte-like cells in a mesenchymal to epithelial transition hypothesis [43]. This still very controversial chapter remains to be written. In human liver, immature cells called "intermediate hepatobiliary cells" or "hepatic progenitor cells" have also been found to reside in the canal of Hering or near intralobular bile ducts. Their identity, function and molecular regulation are discussed in a recent review [44]. A consensual definition of this hepatocyte progenitor cell population is still awaited. Recently, Foxl1 was proposed as a mouse lineage marker for both hepatocytes and cholangiocytes but it has yet to be demonstrated that a single cell can have both destinies *in vivo* [45]. In humans, EPCAM, CK19, CD44, CD133 and NCAM have been identified as markers of the progenitor cell population [46,47]. Is the canal of Hering a stem cell niche where true self-renewing stem cells reside, giving rise to a hepatoblasts progeny? Are they other different stem cell niches such as peribiliary hepatocytes or intralobular bile ducts as suggested by Kuwahara [48]? It is yet too early to definitely answer those questions. Oval cell activation has been reported in hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CC). In the same line, CK19 or EpCAM have also been described as markers for cancer stem cells in humans [49]. Various knockout mouse models supposed to be in the Hippo pathway show both the expansion of a progenitor cell compartment as well as CC and/or HCC development. All these data suggest that progenitor cells might have a role in the emergence of liver tumors and will need further confirmation.

To stream or not to stream, that is (still) the question!

Until very recently, the prevailing view was that the adult hepatic stem cell compartment was activated only in case of a hepatocyte proliferative defect, as in massive acute hepatitis in humans or after administration of specific diets or DNA damaging agents in rodents such as 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) diet, choline-deficient ethionine supplemented diet or 2 acetylaminofluorene (2-AAF) treatment. Progressively however, it appeared that these progenitor cells were indeed present in the normal adult liver and increase during the progression of various chronic liver diseases [44].

Recent lineage studies both in mice and in humans brought some surprising evidence that hepatocytes in a normal adult liver could originate from a stem cell population present in the periportal region and contributing to the physiological hepatocyte turnover. Fellous et al. [50] used a somatic mitochondrial DNA mutation in the cytochrome c oxidase gene to demonstrate the clonal progression of mutant hepatocytes that derive from a common precursor cell, rekindling the debate around the streaming liver hypothesis. In mice, using a Cre-based lineage tracing strategy, a Japanese group demonstrated that hepatocytes physiologically differentiate from a sex determining region Y-box 9 (Sox9)-expressing precursor pool of cells located in the bile duct tree with a continuous supply to the adult

liver [51]. The newly formed hepatocytes migrate from the periportal space to the central vein region. Even more surprisingly, hepatocyte differentiation from these precursors is also activated during the regenerative process following bile duct ligation or carbon tetrachloride administration, in contrast to a poor activation after PH (Fig. 2). These data suggest that Sox9 could be a marker of a precursor cell population during physiological cell replacement and regenerative processes. They also underline the notion that liver regeneration induced by toxic aggression or cholestasis involves mechanisms distinct from those observed after PH, questioning all our acquired knowledge on liver regeneration [52]. Finally, a periportal to pericentral expansion of epithelial cells expressing TGF- β signalling components has been observed in regenerating transplanted livers coming from living donors [26]. The disruption of the TGF- β signalling pathway in mice induces the activation of hepatic progenitor cells with activated Wnt signalling after PH [26], a pathway that is indeed supposed to play a role in the proliferation of oval cells in rodents [40]. The respective role and cross-talks of Wnt pathway with Notch, which is involved in biliary differentiation during development and duct remodeling after birth [53,54], NF2/Merlin [55] and Hedgehog pathways [56], in the activation of these progenitor cells compartment will probably be one of the main research axes in the field for the next few years.

Liver progenitor cells and regeneration defects in liver diseases

Liver regeneration defects are often encountered in chronic liver diseases. The progression from fibrosis to cirrhosis is correlated with a reduction of the hepatocyte proliferative capacity. This is in part due to the increasing mitotic-inhibitory hepatocyte nuclear p21 expression and the progressive hepatocyte-specific telomere shortening with fibrosis progression [57–60]. Regeneration is also impaired in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and obesity [61–63], independently of the degree of associated fibrosis, although the precise mechanisms involved is far from understood [64].

Despite the hepatocyte proliferation impairment in cirrhosis, regenerative nodules are a defining pathological feature of this disease. Using a lineage mitochondrial DNA mutation approach, Alison's group recently demonstrated the monoclonality of regenerative nodules and suggested that these cells derived from hepatic progenitor cells [65]. In cirrhosis, as in NASH, a ductular reaction corresponding to the proliferation of cells with progenitor characteristics has been described and its extent can be correlated with both the progression of the disease and the impaired hepatocyte replication [66,67]. The phenotypic characterization of these cells is complex, some papers describing mutually exclusive expression of hepatocytic and biliary markers while others underline the co-expression of both markers in the same cells [47,66]. The origin and fate of these stem cells during liver repair or fibrosis progression are also controversial [68]. An essential point will be to examine the idea that regenerative nodules originate from the ductular reaction, as recently suggested [65], and determine whether they have a malignant potential.

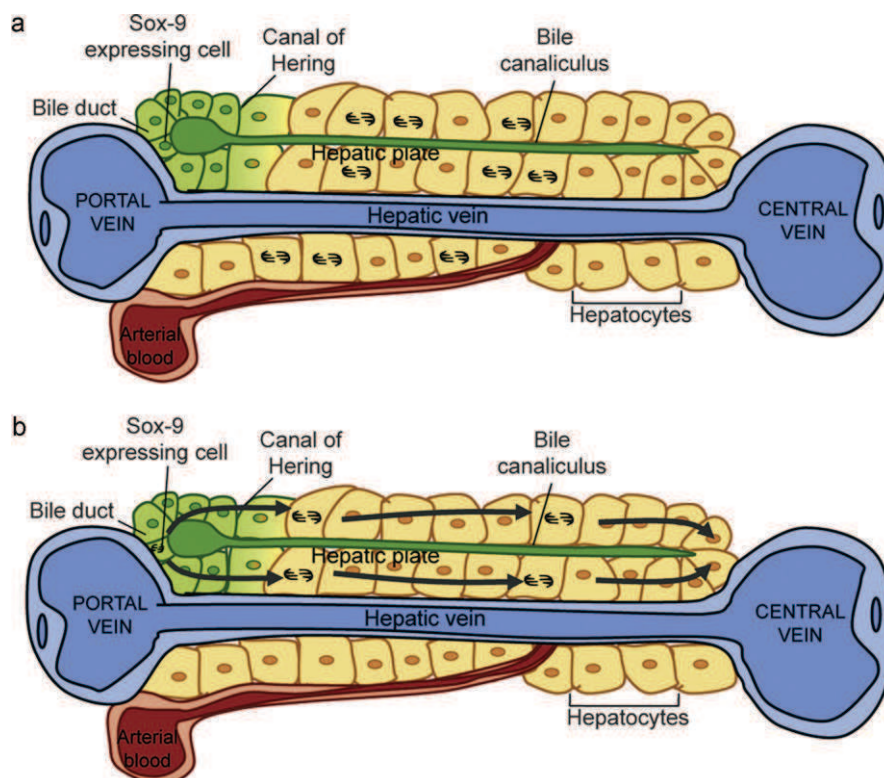


Figure 2 Two models of liver regeneration mechanisms according to the nature of the hepatic injury. a: the stimulus induced by partial hepatectomy (PH) results in the division of mature hepatocytes. Hepatocytes will quit quiescence and enter division in order to restore the initial liver mass. The prevalent hypothesis is that hepatocytes proliferate in a synchronous manner with predominance in the periportal and mediolobular regions; b: according to Furuyama et al. [44], the stimulus induced by bile duct ligation (BDL) or carbon tetrachloride (CCL4) involves rapid differentiation of a Sox-9 expressing progenitors pool coming from the bile duct. These precursors differentiate into mature hepatocytes and the wave of proliferation will migrate from the portal vein to the central vein region to repopulate the lost hepatic mass.

Conclusion

Although we thought that the main molecular pathways involved in liver regeneration after partial hepatectomy were already deciphered, the last few years have yet brought new insights into mechanisms involved in this process. These emerging and sometimes surprising results foreshadow the likely research priorities for the next coming years: a better understanding of the role played by the environment and by progenitor cells in liver repair depending on the disease, a consensual phenotypical definition of adult hepatic progenitor cells, the determination of the cancer stem cells' origin or the characterization of the interconnections between Wnt-beta-catenin/Notch/Hedgehog/TGF- β /Sox9 and Nf2-Mst networks during liver regeneration process will probably be some of the future challenges. This knowledge will be detrimental to develop novel therapeutic approaches based on the induction of hepatocyte proliferation or on stem cell transplantation.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

H. Gilgenkrantz' group is supported by INSERM, CNRS, universit  Paris-Descartes, ANR and INCA. A special thanks goes to C. Mitchell for the critical reading of this manuscript and to N. Fausto whose work and reviews are ever a source of inspiration...

References

- [1] Bucher NL. Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 1963;15:245–300.
- [2] Bucher NL. Liver regeneration: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:615–24.
- [3] Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;151:1273–80.
- [4] Zajicek G, Oren R, Weinreb Jr M. The streaming liver. *Liver* 1985;5:293–300.
- [5] Zajicek G, Schwartz-Arad D, Bartfeld E. The streaming liver. V: time and age-dependent changes of hepatocyte DNA content, following partial hepatectomy. *Liver* 1989;9:164–71.
- [6] Bralet MP, Branchereau S, Brechot C, Ferry N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence

- against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 1994;144:896–905.
- [7] Kennedy S, Rettinger S, Flye MW, Ponder KP. Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream. *Hepatology* 1995;22:160–8.
 - [8] Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, Naka T, Son G, Akira S, et al. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 2005;41:443–50.
 - [9] Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006;312:104–7.
 - [10] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45–53.
 - [11] Latasa MU, Couton D, Charvet C, Lafanechere A, Guidotti JE, Li Z, et al. Delayed liver regeneration in mice lacking liver serum response factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G996–1001.
 - [12] Li J, Campbell JS, Mitchell C, McMahan RS, Yu X, Riehle KJ, et al. Relationships between deficits in tissue mass and transcriptional programs after partial hepatectomy in mice. *Am J Pathol* 2009;175:947–57.
 - [13] Gazit V, Weymann A, Hartman E, Finck BN, Hruz PW, Tzekov A, et al. Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology* 2010;52:2109–17.
 - [14] Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004;40:1322–32.
 - [15] Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Luo J, Stanley SE, Semenkovich CF, et al. Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models. *Hepatology* 2008;48:1097–105.
 - [16] Natarajan A, Wagner B, Sibilia M, The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17081–6.
 - [17] Paranjpe S, Bowen WC, Tseng GC, Luo JH, Orr A, Michalopoulos GK. RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats. *Am J Pathol* 2010;176:2669–81.
 - [18] Factor VM, Seo D, Ishikawa T, Kaposi-Novak P, Marquardt JU, Andersen JB, et al. Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One* 2010;5.
 - [19] Torre C, Benhamouche S, Mitchell C, Godard C, Veber P, Letourneur F, et al. The Transforming Growth Factor- α and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation. *J Hepatol* 2010.
 - [20] Riehle KJ, Campbell JS, McMahan RS, Johnson MM, Beyer RP, Bammler TK, et al. Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J Exp Med* 2008;205:91–103.
 - [21] Haga S, Ogawa W, Inoue H, Terui K, Ogino T, Igarashi R, et al. Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice. *J Hepatol* 2005;43:799–807.
 - [22] Goggin MM, Nelsen CJ, Kimball SR, Jefferson LS, Morley SJ, Albrecht JH. Rapamycin-sensitive induction of eukaryotic initiation factor 4F in regenerating mouse liver. *Hepatology* 2004;40:537–44.
 - [23] Haga S, Ozaki M, Inoue H, Okamoto Y, Ogawa W, Takeda K, et al. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 2009;49:204–14.
 - [24] Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, Russell WE, Whitehead R, Parks WT, et al. Inactivation of TGF- β signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* 2005;24:3028–41.
 - [25] Oe S, Lemmer ER, Conner EA, Factor VM, Leveen P, Larsson J, et al. Intact signaling by transforming growth factor β is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004;40:1098–105.
 - [26] Thenappan A, Li Y, Kitisin K, Rashid A, Shetty K, Johnson L, et al. Role of transforming growth factor β signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver. *Hepatology* 2010;51:1373–82.
 - [27] Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Schouten HJ, Meijer S, van Rooijen N, et al. Kupffer cell depletion by C12MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 2000;20:66–77.
 - [28] Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1639–42.
 - [29] Tumanov AV, Koroleva EP, Christiansen PA, Khan MA, Ruddy MJ, Burnette B, et al. T cell-derived lymphotoxin regulates liver regeneration. *Gastroenterology* 2009;136:694–704 [e4].
 - [30] Sun R, Gao B. Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon- γ). *Gastroenterology* 2004;127:1525–39.
 - [31] Nakashima H, Inui T, Habu Y, Kinoshita M, Nagao S, Kawaguchi A, et al. Activation of mouse natural killer T cells accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 2006;131:1573–83.
 - [32] Dong Z, Zhang J, Sun R, Wei H, Tian Z. Impairment of liver regeneration correlates with activated hepatic NKT cells in HBV transgenic mice. *Hepatology* 2007;45:1400–12.
 - [33] Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001;294:559–63.
 - [34] Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 2010;468:310–5.
 - [35] Hoehme S, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Schormann W, Hermes M, et al. Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:10371–6.
 - [36] Wang L, Wang CM, Hou LH, Dou GR, Wang YC, Hu XB, et al. Disruption of the transcription factor recombination signal-binding protein-Jkappa (RBP-J) leads to veno-occlusive disease and interfered liver regeneration in mice. *Hepatology* 2009;49:268–77.
 - [37] Tordjmann T. Hippo signalling: liver size regulation and beyond. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011.
 - [38] Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* 2007;130:1120–33.
 - [39] Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev* 2010;24:862–74.
 - [40] Apte U, Gkretsi V, Bowen WC, Mars WM, Luo JH, Donthamsetty S, et al. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology* 2009;50:844–51.
 - [41] Hand NJ, Master ZR, Le Lay J, Friedman JR. Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs. *Hepatology* 2009;49:618–26.
 - [42] Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, et al. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2010;51:1735–43.
 - [43] Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 2009;50:2007–13.
 - [44] Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 2009;137:466–81.

- [45] Sackett SD, Li Z, Hurtt R, Gao Y, Wells RG, Brondell K, et al. Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* 2009;49:920–9.
- [46] Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(Suppl 1):203–12.
- [47] Zhang L, Theise N, Chua M, Reid LM. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* 2008;48:1598–607.
- [48] Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendsward E, Theise ND. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 2008;47:1994–2002.
- [49] Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009;136:1012–24.
- [50] Fellous TG, Islam S, Tadrous PJ, Elia G, Kocher HM, Bhattacharya S, et al. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* 2009;49:1655–63.
- [51] Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011;43:34–41.
- [52] Mahrouf-Yorgov M, Collin de l'Hortet A, Cooson C, Slama A, Abdoun E, Guidotti J, et al. Increased susceptibility to liver fibrosis with age is correlated with an altered inflammatory response. *Rejuvenation Res* 2011.
- [53] Geisler F, Nagl F, Mazur PK, Lee M, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, et al. Liver-specific inactivation of Notch2, but not Notch1, compromises intrahepatic bile duct development in mice. *Hepatology* 2008;48:607–16.
- [54] Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, et al. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 2009;136:1727–39.
- [55] Benhamouche S, Curto M, Saotome I, Gladden AB, Liu CH, Giovannini M, et al. Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes Dev* 2010;24:1718–30.
- [56] Omenetti A, Choi S, Michelotti G, Diehl AM. Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol* 2011;54:366–73.
- [57] Paradis V, Youssef N, Dargere D, Ba N, Bonvoust F, Deschattrette J, et al. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 2001;32:327–32.
- [58] Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 2002;16:935–42.
- [59] Marshall A, Rushbrook S, Davies SE, Morris LS, Scott IS, Vowler SL, et al. Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2005;128:33–42.
- [60] Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJJonsson JR. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 2005;41:809–18.
- [61] Farrell GC, Robertson GR, Leclercq I, Horsmans Y. Liver regeneration in obese mice with fatty livers: does the impairment have relevance for other types of fatty liver disease? *Hepatology* 2002;35:731–2.
- [62] Leclercq IA, Field J, Farrell GC. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology* 2003;124:1451–64.
- [63] Aoyama T, Ikejima K, Kon K, Okumura K, Arai K, Watanabe S. Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A(y) mice. *Hepatology* 2009;49:1636–44.
- [64] Mitchell C, Gilgenkrantz H. Had Prometheus known, would he have preferred to be obese? *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:2053–4.
- [65] Lin WR, Lim SN, McDonald SA, Graham T, Wright VL, Peplow CL, et al. The histogenesis of regenerative nodules in human liver cirrhosis. *Hepatology* 2010;51:1017–26.
- [66] Zhou H, Rogler LE, Teperman L, Morgan G, Rogler CE. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology* 2007;45:716–24.
- [67] Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Balthal PS, et al. Progressive fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 2007;133:80–90.
- [68] Greenbaum LE, Wells RG. The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:222–9.

Review Article

EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration

Alexandra Collin de l'Hortet,^{1,2} Hélène Gilgenkrantz,^{1,2} and Jacques-Emmanuel Guidotti^{1,2}

¹*Institut Cochin, Department of Endocrinology Metabolism and Cancer, Université Paris-Descartes, CNRS, UMR8104, 75014 Paris, France*

²INSERM, U1016, 75014 Paris, France

Correspondence should be addressed to Jacques-Emmanuel Guidotti, jacques-emmanuel.guidotti@inserm.fr

Received 21 May 2012; Accepted 11 July 2012

Academic Editor: Anne Corlu

Copyright © 2012 Alexandra Collin de l'Hortet et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Unraveling the molecular clues of liver proliferation has become conceivable thanks to the model of two-third hepatectomy. The synchronicity and the well-scheduled aspect of this process allow scientists to slowly decipher this mystery. During this phenomenon, quiescent hepatocytes of the remnant lobes are able to reenter into the cell cycle initiating the G1-S progression synchronously before completing the cell cycle. The major role played by this step of the cell cycle has been emphasized by loss-of-function studies showing a delay or a lack of coordination in the hepatocytes G1-S progression. Two growth factor receptors, c-Met and EGFR, tightly drive this transition. Due to the level of complexity surrounding EGFR signaling, involving numerous ligands, highly controlled regulations and multiple downstream pathways, we chose to focus on the EGFR pathway for this paper. We will first describe the EGFR pathway in its integrity and then address its essential role in the G1/S phase transition for hepatocyte proliferation. Recently, other levels of control have been discovered to monitor this pathway, which will lead us to discuss regulations of the EGFR pathway and highlight the potential effect of misregulations in pathologies.

1. Introduction

Although mammals have almost completely lost the fascinating regeneration capacities of amphibians, their liver retained this unique ability. This process is evolutionarily conserved, presumably because it is critical to mammals' survival. Two-thirds partial hepatectomy (PH) in rodents has been used extensively to decipher the molecular and cellular clues of liver regeneration. During this process, the liver regenerates through hepatocytes, without the help of a stem cell compartment. A particularly fascinating point about this process is that near all quiescent and differentiated hepatocytes quit the G0 phase in a tightly synchronous manner to progress into the G1/S phase transition and replicate their DNA. This massive coordinated entry into the cell cycle is illustrated by a sharp peak of BrdU (Bromodeoxyuridine) incorporation whose timing differs among species (24 hours in rats and 36 to 42 hours in mice), reflecting the variability in the length of the G1 phase. Even if hepatocyte S phase entry

is tightly synchronized, hepatocyte replication starts from periportal area and progresses rapidly towards perivenous area. Other nonparenchymal cells such as stellate cells, biliary and endothelial cells proliferate after hepatocytes, responding potentially to other signals.

This paper will focus on the molecular mechanisms involved in this synchronous entry into the cell cycle, highlighting the specific role of the epidermal growth factor receptor (EGFR) during this process in all its complexity.

2. Growth Factors and the Synchronous Entry of the Hepatocytes into the Cell Cycle

Hepatocyte proliferation is preceded by an inflammatory stimulus, described in the pioneering work of Nelson Fausto as the “priming phase” [1, 2]. This first step is reversible since, without the subsequent involvement of growth factors, hepatocytes do not progress through cell cycle and return to quiescence. It involves the secretion of cytokines by

nonparenchymal cells such as Kupffer cells and poises hepatocytes to become receptive to these growth factors [3, 4]. *In vivo*, this priming stage is required since hepatocytes exhibit only a minimal response to transforming growth factor alpha (TGF- α), epidermal growth factor (EGF), or hepatocyte growth factor (HGF) without it. In contrast, these factors are potent mitogens *in vitro* [5–8]. In primary culture, hepatocytes replicate their DNA synchronously after addition of EGFR ligands, suggesting that isolation of hepatocytes from the liver induces priming [6, 9, 10] and for review [11–13].

After cytokines have triggered the G0 to G1 phase transition, required growth factors for the progression through the cell cycle into the S phase are signaling through two main tyrosine-kinase receptors: EGFR and c-Met.

HGF is the main ligand of c-Met receptor. It is mainly secreted by macrophages and endothelial liver cells [14]. Overexpression of HGF in the liver of transgenic mice increases hepatocyte proliferation during postnatal development and accelerated liver regeneration after PH but has minor effects at adult stage in a quiescent liver [15–17]. On the contrary, conditional deletion of this receptor, as well as studies using RNAi in the liver of mice, caused either a significant decrease in the peak of proliferation [18, 19] or a delay of S-phase entry [20]. Moreover, Thorgeirsson's team indicated that c-Met is required for G2/M progression as well as entering the cell cycle *in vivo* [19].

As opposed to HGF/c-Met axis, EGFR has numerous ligands (EGF, amphiregulin, HB-EGF, TGF- α , epiregulin, betacellulin, epigen). For this reason, the implication of this pathway after PH has been studied extensively throughout the years, as it involves several growth factors and downstream pathways to control the proliferation balance. Interestingly, Mitchell et al. showed that after 1/3 PH in mice, there is a lack of a synchronous wave of DNA replication [21]. They then observed that, among the growth factors induced during liver regeneration, the secretion peak of HB-EGF usually observed 24 h after 2/3 PH was absent after the 1/3 PH [21]. HB-EGF injection in 1/3 hepatectomized mice is then sufficient to restore a peak of BrdU incorporation in hepatocytes [21]. Besides highlighting the robust mitogen potential of HB-EGF, this study indicated the importance of the EGFR pathway in the synchronous induction of DNA replication in a dose-dependent manner after PH.

3. EGFR Pathway

3.1. General Description of EGFR. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), also known as ErbB-1, is a plasma membrane glycoprotein, which belongs to the ErbB family of receptor tyrosine kinases (RTKs) jointly with ErbB-2, ErbB-3, and ErbB-4 [22]. It contains an extracellular domain with two cysteine-rich regions, a single transmembrane-spanning region, and a well-conserved cytoplasmic tyrosine kinase domain [23]. Upon ligand binding, ErbB proteins can either homo- or heterodimerize with other members of the ErbB family to activate downstream signaling pathways that regulate proliferation, growth, and differentiation [24].

EGFR was the first member of this family as well as the first RTK to be discovered [25] and plays an essential role in the development of epithelial cells but also in tumors of epithelial cell origin [26]. Ligand induced EGFR dimerization leads to receptor autophosphorylation at tyrosine residues (Figure 1). Some of them can be regulated via other signals like growth hormone [27, 28] or oxidative stress [29, 30]. Phosphotyrosine residues allow the recruitment of specific partners to activate different downstream pathways. EGFR controls a variety of signals ranging from cell proliferation, cell motility, apoptosis decrease, to epithelial-mesenchymal transition, upregulation of matrix metalloproteinases, and has even been proposed to be involved in stem-cell maintenance [31]. Moreover, EGFR has also been shown to regulate downstream targets by directly translocating its internal region into the nucleus, activating cell cycle genes such as Cyclin D1 [32] or genes involved in inflammation like COX-2 [33]. Interestingly, Cox-2-deficient mice showed an impaired liver regeneration [34].

EGFR signaling is regulated in part by endocytic sorting [35, 36]. Upon ligand binding, EGFR is internalized and trafficked to the endosome. Depending on ligand/EGFR complex stability [37] and ubiquitination process by cbl family proteins [38], EGFR is either degraded in the lysosomal compartment or recycled to the plasma membrane [35, 37, 39]. This process may represent an important negative feedback regulatory mechanism to control EGFR signaling [35, 36].

3.2. EGFR Pathway in the Liver. There is a strong expression of EGFR in the adult liver, but also during development and regeneration, suggesting an important role for its function [40]. Disruption of EGFR in mice has led to death from mid-gestation up to third week depending on the genetic background, showing various signs of abnormalities to multiple organs including the skin, kidney, brain, gastrointestinal tract, and the liver with thickened hepatocyte cords, distorted sinusoidal anatomy, and abnormally vacuolized nuclei [41]. Specific deletion of EGFR in hepatocytes did not reveal any phenotypical abnormality apart from a reduction in body weight [42]. It has been shown that EGFR ligands exhibit functional differences in models of paracrine and autocrine signaling [43]. Several ligands, such as amphiregulin, epidermal growth factor (EGF), heparin-binding EGF (HB-EGF), betacellulin, epiregulin, and TGF- α have been shown to be able to activate the EGFR pathway and some of them induced strong mitogens signals in the liver [44]. There is no evidence that these ligands bind specifically to EGFR and not to other ErbB proteins with whom EGFR can dimerize, although their essential role during liver regeneration has been demonstrated for some of them as described below [45].

There are four main downstream pathways usually associated with EGFR activation: Ras/MAPK, PI3K/Akt, signal transducer and activator of transcription (Stats) and phospholipase C-gamma 1 (PLCY1) pathways [46] (Figure 1). However, it has been shown in different epithelial cell types *in vitro* that ligands binding to EGFR induce different

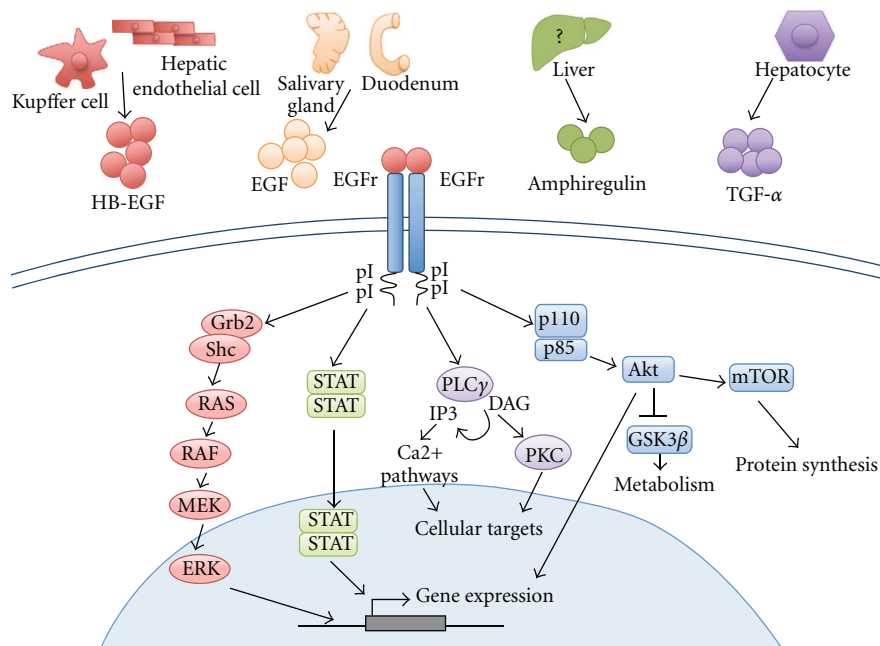


FIGURE 1: EGFR induced signaling pathways. The major source of each EGFR ligands involved in liver regeneration is schematized. Amphiregulin liver induction right after PH is not sufficient to determine the cellular origin of this secretion. Upon binding of its ligands, EGFR homodimerizes leading to phosphorylation of many tyrosine residues localized in the carboxy-terminal tail of EGFR. Phospho-EGFR is then able to recruit adaptor proteins. They transduce the EGFR signaling by inducing several EGFR-dependent pathways, including the RAS-MAPkinase, PI3K-AKT, PLCγ, and Stat pathways. Collectively these pathways control proliferation, differentiation, migration, and survival of the cell.

downstream signaling pathways according to their affinity. While high affinity ligands (10% of EGFR pool) activate Ras/MAPK and PI3K/Akt pathways, low affinity ligands (90% of EGFR pool) induce Stats and PLCY1 pathways [47]. It is now clear that those different pathways are highly interlinked, but for the following they will be described separately.

Once activated, the internal region of EGFR can serve as a docking site for Src homology 2 domains such as Grb2 and Shc [48, 49]. Grb2 or Shc then interacts with Ras, leading to an interaction with Raf, which will in turn activate the whole MAP kinases pathway [48–50]. The activation of EGFR can also provide a docking site for p85, which is the protein subunit of PI3K. Once activated, it will in turn phosphorylate Akt to promote cell survival and proliferation [51]. In the liver, EGFR-dependent Stats activation does not depend upon JAK kinases activation, as it is usually the case. Instead, Stats have been proposed to be constitutively associated to EGFR, becoming active directly by EGFR phosphorylation [49, 52]. More recently, the Src-kinase has been proposed to activate Stats through EGFR activation [53, 54]. The precise mechanism of PLCY1 activation remains unclear, but it appears that PLCY1 is also directly associated to EGFR but does not need tyrosine phosphorylation [55]. The activation of PLCY1 will yield 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). DAG can then activate PKC whereas IP3 can activate Ca²⁺-dependent pathways [56].

4. EGFR Pathway during the G1-S Phase in Hepatocytes

4.1. The Input of EGFR Ligands in Invalidation Mouse Models. The mitogenic action of the EGFR signal was first determined *in vitro*, on primary culture of hepatocytes. EGFR ligands were added in serum-free medium culture and tested for their capacity to induce hepatocyte proliferation in rodents. Four of them: TGF-α, HB-EGF, EGF, amphiregulin, were determined as hepatocyte growth factors since they allow their synchronized S phase entry [5–8].

After 2/3 PH, the protein level of these EGFR ligands increases rapidly [8, 57, 58]. Their mitogenic role was studied *in vivo* using ligand injection, gene overexpression, RNA interference, and conditional gene knockout strategies.

Loss of HB-EGF expression by knocking-out the gene led to major impairment of liver regeneration characterized by the absence of hepatocytes synchronized S phase entry [21]. Conversely, liver HB-EGF overexpression in transgenic mice induced a drastic increase of proliferating hepatocytes compared to wildtype nontransgenic littermates [59].

Salivary glands ablation in rodent [60–62], which are the main source of EGF, provoke a main liver regenerative defect hepatocytes being blocked in G1 phase, as it is the case in the conditional amphiregulin knockout mice [8]. After salivary glands ablation, EGF injections restore hepatocyte proliferation in rats [60–62].

Thus, misregulation of these three latter EGFR ligands leads to the same profile of liver regenerative defect characterized by a desynchronized S phase entry of hepatocytes. These results then suggest that these ligands are not redundant during liver regeneration. In contrast to these three liver EGFR ligands, gene inactivation of TGF- α in mice had no effect on liver regeneration [63] although it has been demonstrated on hepatocytes primary culture, that TGF- α has the same mitogen capacities as EGF, amphiregulin or HB-EGF [5, 6, 8, 64–66].

Different non-exclusive hypotheses can be proposed to understand the non-redundancy of HB-EGF, EGF and amphiregulin ligands. This can be explained by the importance of ligands sequential binding, by different ligands activating different EGFR downstream pathways or by the necessity to reach a threshold of total ligands quantity, in order to induce proliferative signals. Regarding TGF- α , the paradoxical results obtained *in vitro* and *in vivo*, can be explained if we hypothesize that already expressed EGFR ligands compensate for TGF- α . Genetic replacement of one ligand by another one at the same physiological level using knocking-in strategies, could help to understand these discrepancies.

4.2. The EGF Receptor during Regeneration. The role of EGFR (ErbB1) in the G1 phase of the cell cycle in hepatocytes has also been studied *in vivo* either by RNA interference injection in rats [67] or by conditional gene inactivation in mice [42]. Both experiments induced a major impairment of liver regeneration resulting in an altered progression into the G1 phase. However, mutant livers can finally complete regeneration suggesting that EGFR is a critical regulator of hepatocyte proliferation in the initial phases of this process. As opposed to other tissues, ErbB-2 and ErbB-4 are not expressed in the regenerating liver and thus, cannot heterodimerize with EGFR [40]. However, in contrast with liver regeneration, it has been observed that ErbB-2 is re-expressed in primary culture of hepatocytes, participating to the induction of proliferation *in vitro* [68, 69]. ErbB-3 is induced after PH but its ligands are not known to participate to hepatocyte proliferation [40].

The common molecular mechanism between all these studies consists in a downregulation of cyclin D1 expression, the first cyclin that is activated during progression in G1 phase [70, 71]. However, there is very little information on signaling pathways activated downstream of EGFR in hepatocytes to induce their proliferation. In primary culture of hepatocytes, Erk1/Erk2 and PI3K/AKT cascades have been shown to be activated by EGF to induce hepatocyte proliferation [72, 73]. However, during liver regeneration of EGFR knock outs specifically in hepatocytes in mice, none of these canonical downstream pathways were found dysregulated [42], while livers of rats injected with an EGFR RNAi showed a Stat3 misregulation [67]. Regarding knock outs experiments, the authors only reported a defect in the NF- κ B and in p38 activation during the G1 phase [42]. The essential role of NF- κ B during liver regeneration is to “prime” hepatocytes and not to participate to the G1 phase progression [4, 10]. However it was suggested that it could

control cyclin D1 transcription [74, 75]. *In vitro* studies showed that EGFR could activate Ca²⁺ dependent pathways such as Ral and NF- κ B through the phosphorylation of PLC γ . PLC γ is one of the possible downstream pathways activated by EGFR. It has been shown that the increased activity of nuclear PLC in regenerating rat occurs before DNA synthesis peak after PH [76]. Moreover, Farrell’s group pointed out the role of the EGFR/PLC γ axis in hepatocyte proliferation in a model of chronic ethanol consumption [77].

In rats injected with RNAi directed against EGFR, Stat3 transcription downregulation was observed by transcriptomic approach [67]. This result may be relevant since Stat3 is a target of EGFR and has the capacity to activate proliferation through cyclin D1 in other cell types. However, it would have been interesting to check both the protein expression and activation level of Stat during the regenerating process, as this hypothesis does not match with cell culture experiments. It was indeed demonstrated that the Stats (Stat3 and Stat5) were not recruited for EGFR dependent hepatocyte proliferation *in vitro* [78].

The discrepancy between the *in vitro* and *in vivo* results makes it difficult to fully understand which are the intracellular targets required to induce the EGFR dependent progression into the S phase.

5. Regulation of the EGFR Pathway during Liver Regeneration

5.1. Regulation of the Ligands. Liver regeneration efficiency could indeed be controlled either by EGFR ligands induction and/or by EGFR activation. While various factors have been shown to regulate EGFR ligands in the quiescent liver, very little is known during the regenerative process when these factors are induced.

The Hippo signaling pathway, well known to be involved in cell proliferation, could also regulate the EGFR pathway through its pivotal effector, YAP (Yes-associated protein). Indeed, it has been shown that YAP regulates amphiregulin at a transcriptional level [79]. Interestingly, one study showed that YAP protein level increases after PH, suggesting a role in liver regeneration [80]. Loss of Hippo signaling in the mouse liver has been shown to lead to YAP induction and liver hyperplasia with hepatocytes progenitors proliferation [81–83]. However, no study has been yet performed after partial hepatectomy in YAP knockout mice to comfort this potential role.

Different members of the ADAM family induce the maturation of EGFR ligands, by cleaving them, and thus increasing their bioavailability for EGFR binding [84]. ADAM 10 is able to cleave EGF transmembrane precursors [85]. ADAM 17, also known as tumour necrosis factor- α -(TNF- α)-converting, enzyme, or TACE, can shed amphiregulin, TGF- α and HB-EGF precursors [86, 87]. It has been suggested that ADAM17, upon TNF- α addition in hepatocyte cell culture, transactivates EGFR by cleaving TGF- α , increasing hepatocyte proliferation [88]. As for liver regeneration, ADAM 17 expression increases at the late G1-phase corroborating

a potential regulator role of EGFR signaling during this regenerative process [89].

5.2. Regulation of the Receptor. Regarding the receptor, we recently pointed out the major role played by the growth hormone (GH) pathway to control EGFR. GH is a pleiotropic hormone that plays a major role in proliferation, differentiation, and metabolism via its specific receptor. It has been previously suggested that GH signaling pathways are required for normal liver regeneration [90, 91]. Consequently, we recently investigated the mechanism by which GH controls liver regeneration. GH receptor knockout mice (GHRKO) showed a major liver regeneration impairment correlated with a downregulation of ERK1/ERK2 activation [92]. We showed that GH controlled the EGFR expression at the mRNA level in liver from quiescent stage until the mid G1-phase [92]. Most of GH physiological effects are mediated by the Stat5 transcription factor. Interestingly, EGFR expression was drastically down regulated in the liver of mice deleted for Stat5b in their hepatocytes [93]. However, chromatin immunoprecipitation experiments failed to demonstrate that Stat5b binds to EGFR promoter and suggested that it acts indirectly through intermediate proteins [93]. IGF-1, the major target gene of GH/Stat5b axis in the liver could have been an interesting target since it is known to be involved in liver regeneration control and it is drastically downregulated in GHRKO mice [91, 94]. However, we demonstrated that it is not the case, its forced expression in GHRKO mice hepatocytes failing to rescue EGFR expression (personal data). Interestingly, GH has also been described to control EGFR at posttranscriptional level, inducing its phosphorylation in quiescent liver [27, 28]. Accordingly with these data, EGFR failed to be activated by phosphorylation throughout the G1 phase in the hepatectomized GHRKO mice, even when it was reexpressed in mid/late G1-phase [92].

Bile acids that have been shown to contribute to liver regeneration have recently been considered as an intermediate in the interplay between EGFR and the Fas apoptotic pathway. Indeed, CD95L and hydrophobic bile acids are known to transactivate EGFR, but depending on the cell type, CD95-EGFR-mediated signalling ends up in cell apoptosis or cell proliferation. Thus, EGFR activation by CD95L or bile acids can lead to hepatic stellate cell proliferation but hepatocyte apoptosis [95].

Finally, the Wnt/ β -Catenin pathway that is activated during the mid G1-phase during liver regeneration process could also participate to EGFR regulation during the liver regeneration process [96, 97]. β -catenin has been proposed to control EGFR in quiescent liver at a transcriptional level [98], but there is no clear evidence for a direct action of β -catenin via the putative Lef/Tcf site present on the EGFR promoter [98]. However, liver regeneration studies on mice deleted for *ctnnb1* (the gene coding for β -catenin), although leading to a liver regeneration delay, did not point out an EGFR expression impairment [96, 97, 99]. We can hypothesize that β -catenin pathway compensates for EGFR defect in GHRKO mice from mid G1-phase when EGFR expression was reinduced.

6. Conclusion

Altogether, these data highlight the major role played by growth factors via EGFR in the liver regeneration process. Its activation during the G1 phase controls the cell cycle progression of hepatocytes from the G1 phase until the S phase leading to the synchronized hepatocytes S-phase entry. In liver regeneration, even though ligands have been identified, downstream pathways leading to hepatocytes S phase entry as well as the mechanisms that regulate EGFR pathway activation remain to be determined. In this context, our results point out the major role played by GH to control its expression and activation during the regenerative process [92].

The degree of complexity of hepatocyte proliferation's regulation by growth factors is reinforced by the question of a potential crosstalk and/or redundancy between EGFR and HGF pathways since they both induce hepatocytes G1/S progression and can activate the same downstream gene cascades [18–20, 42, 67]. A relationship between these pathways has been suggested by the observation that loss of c-Met or EGFR both lead to major liver regeneration impairment. This could result from the necessity of two independent pathways or by the existence of an essential interrelation between both pathways, to induce a robust hepatocyte proliferation signal. Since *in vitro* studies led to discordant results, it should be interesting in the future to test the redundancy or independence of c-met and EGFR pathways for liver regeneration in double knockout mice.

Given the importance of EGFR signaling to control hepatocytes division and its regulation by GH, it will be interesting to determine the incidence of misregulations of the GH/EGFR axis on the liver proliferative capacity in hepatic physiopathology. There have been numerous studies in human and in mice reporting defects of the GH signaling in various liver pathologies. For example, liver cirrhosis has been associated with the inhibition of GH signaling in the liver [100, 101]. Obesity, often associated with hepatic steatosis and insulinoreistance, is also characterized by a decrease of GH level in the serum of patients [102, 103]. We found in different mouse models that hepatic steatosis is associated both with a downregulation of GH pathway and a downregulation of EGFR expression (personal data). We therefore hypothesize that the loss of liver proliferation capacity in liver steatosis is related to the GH/EGFR axis misregulation.

In contrast, the EGFR signaling upregulation has been involved in cancer development in many tissues [104]. In hepatocellular carcinoma, its misregulation was found in 60 to 80 percent of patients, depending on studies, leading to the suggestion that EGFR signaling upregulation was associated with the increased proliferative capacity of liver tumoral cells [105].

The complete deciphering of EGFR signaling regulatory pathways resulting in this tricky balance will therefore be crucial in the future to develop appropriate therapeutic strategies allowing stimulation of hepatocyte proliferation in chronic liver diseases if required or in contrast, to reduce it in cases of tumoral progression.

Authors' Contribution

Hélène Gigenkrantz and Jacques-Emmanuel Guidotti contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors' laboratory was supported by grants from AFEF (Association Française pour l'Étude du Foie), Agence de la Biomédecine, ANR (Agence Nationale pour la Recherche) and INSERM.

References

- [1] J. E. Mead, L. Braun, D. A. Martin, and N. Fausto, "Induction of replicative competence ("priming") in normal liver," *Cancer Research*, vol. 50, no. 21, pp. 7023–7030, 1990.
- [2] E. M. Webber, P. J. Godowski, and N. Fausto, "In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus," *Hepatology*, vol. 19, no. 2, pp. 489–497, 1994.
- [3] D. E. Cressman, L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis et al., "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6- deficient mice," *Science*, vol. 274, no. 5291, pp. 1379–1383, 1996.
- [4] Y. Yamada, I. Kirillova, J. J. Peschon, and N. Fausto, "Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 4, pp. 1441–1446, 1997.
- [5] N. Ito, S. Kawata, S. Tamura et al., "Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 198, no. 1, pp. 25–31, 1994.
- [6] G. D. Block, J. Locker, W. C. Bowen et al., "Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF- α in a chemically defined (HGM) medium," *Journal of Cell Biology*, vol. 132, no. 6, pp. 1133–1149, 1996.
- [7] N. Fausto, A. D. Laird, and E. M. Webber, "Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration," *The FASEB Journal*, vol. 9, no. 15, pp. 1527–1536, 1995.
- [8] C. Berasain, E. R. García-Trevijano, J. Castillo et al., "Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice," *Gastroenterology*, vol. 128, no. 2, pp. 424–432, 2005.
- [9] G. K. Michalopoulos, "Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control," *The FASEB Journal*, vol. 4, no. 2, pp. 176–187, 1990.
- [10] N. Fausto, "Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 3, no. 3, pp. 219–234, 1991.
- [11] G. K. Michalopoulos, "Liver regeneration," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 213, no. 2, pp. 286–300, 2007.
- [12] K. J. Riehle, Y. Y. Dan, J. S. Campbell, and N. Fausto, "New concepts in liver regeneration," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 26, supplement 1, pp. 203–212, 2011.
- [13] H. Gilgenkrantz and A. Collin de l'Hortet, "New insights into liver regeneration," *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, vol. 35, no. 10, pp. 623–629, 2011.
- [14] K. Matsumoto and T. Nakamura, "Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions," *Critical Reviews in Oncogenesis*, vol. 3, no. 1–2, pp. 27–54, 1992.
- [15] A. Bell, Q. Chen, M. C. DeFrances, G. K. Michalopoulos, and R. Zarnegar, "The five amino acid-deleted isoform of hepatocyte growth factor promotes carcinogenesis in transgenic mice," *Oncogene*, vol. 18, no. 4, pp. 887–895, 1999.
- [16] H. Sakata, H. Takayama, R. Sharp, J. S. Rubin, G. Merlino, and W. J. LaRochelle, "Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers," *Cell Growth and Differentiation*, vol. 7, no. 11, pp. 1513–1523, 1996.
- [17] G. Shiota and H. Kawasaki, "Hepatocyte growth factor in transgenic mice," *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 79, no. 5, pp. 267–277, 1998.
- [18] M. Borowiak, A. N. Garratt, T. Wüstefeld, M. Strehle, C. Trautwein, and C. Birchmeier, "Met provides essential signals for liver regeneration," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 29, pp. 10608–10613, 2004.
- [19] V. M. Factor, D. Seo, T. Ishikawa et al., "Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 9, Article ID e12739, 2010.
- [20] S. Paranjpe, W. C. Bowen, A. W. Bell, K. Nejak-Bowen, J. H. Luo, and G. K. Michalopoulos, "Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference," *Hepatology*, vol. 45, no. 6, pp. 1471–1477, 2007.
- [21] C. Mitchell, M. Nivison, L. F. Jackson et al., "Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 4, pp. 2562–2568, 2005.
- [22] A. W. Burgess, "EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic target," *Growth Factors*, vol. 26, no. 5, pp. 263–274, 2008.
- [23] A. L. Schechter, D. F. Stern, and L. Vaidyanathan, "The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-M(r) tumour antigen," *Nature*, vol. 312, no. 5994, pp. 513–516, 1984.
- [24] D. J. Riese II and D. F. Stern, "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network," *BioEssays*, vol. 20, no. 1, pp. 41–48, 1998.
- [25] S. Cohen and G. A. Elliott, "The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 40, pp. 1–5, 1963.
- [26] A. B. Singh and R. C. Harris, "Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands," *Cellular Signalling*, vol. 17, no. 10, pp. 1183–1193, 2005.
- [27] T. Yamauchi, K. Ueki, K. Tobe et al., "Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone," *Nature*, vol. 390, no. 6655, pp. 91–96, 1997.
- [28] T. Yamauchi, K. Ueki, K. Tobe et al., "Growth hormone-induced tyrosine phosphorylation of EGF receptor as an essential element leading to MAP kinase activation and gene expression," *Endocrine Journal*, vol. 45, supplement, pp. S27–S31, 1998.
- [29] T. Ravid, C. Sweeney, P. Gee, K. L. Carraway, and T. Goldkorn, "Epidermal growth factor receptor activation under

- oxidative stress fails to promote c-Cbl mediated down-regulation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 34, pp. 31214–31219, 2002.
- [30] S. Filosto, E. M. Khan, E. Tognon et al., "EGF receptor exposed to oxidative stress acquires abnormal phosphorylation and aberrant activated conformation that impairs canonical dimerization," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 8, Article ID e23240, 2011.
- [31] B. A. Gusterson and K. D. Hunter, "Should we be surprised at the paucity of response to EGFR inhibitors?" *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 5, pp. 522–527, 2009.
- [32] S. Y. Lin, K. Makino, W. Xia et al., "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor," *Nature Cell Biology*, vol. 3, no. 9, pp. 802–808, 2001.
- [33] H. W. Lo, X. Cao, H. Zhu, and F. Ali-Osman, "Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes," *Molecular Cancer Research*, vol. 8, no. 2, pp. 232–245, 2010.
- [34] M. Casado, N. A. Callejas, J. Rodrigo et al., "Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 11, pp. 2016–2018, 2001.
- [35] K. Roepstorff, L. Grøvdal, M. Grandal, M. Lerdrup, and B. van Deurs, "Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 129, no. 5, pp. 563–578, 2008.
- [36] A. Sorkin and L. K. Goh, "Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs," *Experimental Cell Research*, vol. 314, no. 17, pp. 3093–3106, 2008.
- [37] K. Roepstorff, M. V. Grandal, L. Henriksen et al., "Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor," *Traffic*, vol. 10, no. 8, pp. 1115–1127, 2009.
- [38] G. Levkowitz, H. Waterman, E. Zamir et al., "c-Cbl1/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor," *Genes and Development*, vol. 12, no. 23, pp. 3663–3674, 1998.
- [39] S. J. Decker, "Epidermal growth factor and transforming growth factor- α induce differential processing of the epidermal growth factor receptor," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 166, no. 2, pp. 615–621, 1990.
- [40] R. S. Carver, M. C. Stevenson, L. A. Scheving, and W. E. Russell, "Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration," *Gastroenterology*, vol. 123, no. 6, pp. 2017–2027, 2002.
- [41] D. W. Threadgill, A. A. Dlugosz, L. A. Hansen et al., "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype," *Science*, vol. 269, no. 5221, pp. 230–234, 1995.
- [42] A. Natarajan, B. Wagner, and M. Sibilio, "The EGF receptor is required for efficient liver regeneration," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 43, pp. 17081–17086, 2007.
- [43] K. J. Wilson, C. Mill, S. Lambert et al., "EGFR ligands exhibit functional differences in models of paracrine and autocrine signaling," *Growth Factors*, vol. 30, no. 2, pp. 107–116, 2012.
- [44] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, "Untangling the ErbB signalling network," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, no. 2, pp. 127–137, 2001.
- [45] N. Fausto, J. S. Campbell, and K. J. Riehle, "Liver regeneration," *Hepatology*, vol. 43, no. 2, pp. S45–S53, 2006.
- [46] A. Wells, "EGF receptor," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 31, no. 6, pp. 637–643, 1999.
- [47] J. A. Krall, E. M. Beyer, and G. MacBeath, "High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, Article ID e15945, 2011.
- [48] G. Carpenter and S. Cohen, "Epidermal growth factor," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 14, pp. 7709–7712, 1990.
- [49] A. Ullrich and J. Schlessinger, "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity," *Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 203–212, 1990.
- [50] J. Schlessinger, "Cell signaling by receptor tyrosine kinases," *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 211–225, 2000.
- [51] G. A. Rodrigues, M. Falasca, Z. Zhang, S. H. Ong, and J. Schlessinger, "A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 4, pp. 1448–1459, 2000.
- [52] H. Shao, H. Y. Cheng, R. G. Cook, and D. J. Tweardy, "Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor," *Cancer Research*, vol. 63, no. 14, pp. 3923–3930, 2003.
- [53] T. K. Guren, J. Ødegård, H. Abrahamsen et al., "EGF receptor-mediated, c-Src-dependent, activation of Stat5b is down-regulated in mitogenically responsive hepatocytes," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 196, no. 1, pp. 113–123, 2003.
- [54] K. M. Quesnelle, A. L. Boehm, and J. R. Grandis, "STAT-mediated EGFR signaling in cancer," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 102, no. 2, pp. 311–319, 2007.
- [55] D. Rotin, A. M. Honegger, B. L. Margolis, A. Ullrich, and J. Schlessinger, "Presence of SH2 domains of phospholipase C γ 1 enhances substrate phosphorylation by increasing the affinity toward the epidermal growth factor receptor," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 14, pp. 9678–9683, 1992.
- [56] G. Carpenter and Q. S. Ji, "Phospholipase C- γ as a signal-transducing element," *Experimental Cell Research*, vol. 253, no. 1, pp. 15–24, 1999.
- [57] S. Kiso, S. Kawata, S. Tamura et al., "Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy," *Hepatology*, vol. 22, no. 5, pp. 1584–1590, 1995.
- [58] D. B. Stolz, W. M. Mars, B. E. Petersen, T. H. Kim, and G. K. Michalopoulos, "Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat," *Cancer Research*, vol. 59, no. 16, pp. 3954–3960, 1999.
- [59] S. Kiso, S. Kawata, S. Tamura et al., "Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy," *Gastroenterology*, vol. 124, no. 3, pp. 701–707, 2003.
- [60] L. Lambotte, A. Saliez, S. Triest et al., "Effect of sialoadenectomy and epidermal growth factor administration on liver regeneration after partial hepatectomy," *Hepatology*, vol. 25, no. 3, pp. 607–612, 1997.
- [61] D. E. Jones, R. Tran-Patterson, D. M. Cui, D. Davin, K. P. Estell, and D. M. Miller, "Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration," *American Journal of Physiology*, vol. 268, no. 5, pp. G872–G878, 1995.
- [62] S. Noguchi, Y. Ohba, and T. Oka, "Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice," *Journal of Endocrinology*, vol. 128, no. 3, pp. 425–431, 1991.
- [63] W. E. Russell, W. K. Kaufmann, S. Sitaric, N. C. Luetkeke, and D. C. Lee, "Liver regeneration and hepatocarcinogenesis

- in transforming growth factor- α -targeted mice," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 15, no. 3, pp. 183–189, 1996.
- [64] E. Draghi, U. Armato, P. G. Andreis, and L. Mengato, "The stimulation by epidermal growth factor (urogastrone) of the growth of neonatal rat hepatocytes in primary tissue culture and its modulation by serum and associated pancreatic hormones," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 103, no. 1, pp. 129–147, 1980.
- [65] C. De Juan, M. Benito, A. Alvarez, and I. Fabregat, "Differential proliferative response of cultured fetal and regenerating hepatocytes to growth factors and hormones," *Experimental Cell Research*, vol. 202, no. 2, pp. 495–500, 1992.
- [66] J. A. McGowan, A. J. Strain, and N. L. R. Bucher, "DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 108, no. 3, pp. 353–363, 1981.
- [67] S. Paranjpe, W. C. Bowen, G. C. Tseng, J. H. Luo, A. Orr, and G. K. Michalopoulos, "RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats," *American Journal of Pathology*, vol. 176, no. 6, pp. 2669–2681, 2010.
- [68] L. A. Scheving, L. Zhang, M. C. Stevenson, S. K. Eun, and W. E. Russell, "The emergence of ErbB2 expression in cultured rat hepatocytes correlates with enhanced and diversified EGF-mediated signaling," *American Journal of Physiology*, vol. 291, no. 1, pp. G16–G25, 2006.
- [69] L. A. Scheving, M. C. Stevenson, X. Zhang, and W. E. Russell, "Cultured rat hepatocytes upregulate Akt and ERK in an ErbB-2-dependent manner," *American Journal of Physiology*, vol. 295, no. 2, pp. G322–G331, 2008.
- [70] P. Loyer, S. Cariou, D. Glaire, M. Bilodeau, G. Baffet, and C. Guguen-Guillouzo, "Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes *in vitro*: evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 19, pp. 11484–11492, 1996.
- [71] D. G. Rickheim, C. J. Nelsen, J. T. Fassett, N. A. Timchenko, L. K. Hansen, and J. H. Albrecht, "Differential regulation of cyclins D1 and D3 in hepatocyte proliferation," *Hepatology*, vol. 36, no. 1, pp. 30–38, 2002.
- [72] H. Talarmin, C. Rescan, S. Cariou et al., "The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G1 phase progression in proliferating hepatocytes," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 9, pp. 6003–6011, 1999.
- [73] Y. Luo, C. J. Dixon, J. F. Hall, P. J. White, and M. R. Boarder, "A role for Akt in epidermal growth factor-stimulated cell cycle progression in cultured hepatocytes: generation of a hyperproliferative window after adenoviral expression of constitutively active Akt," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 321, no. 3, pp. 884–891, 2007.
- [74] D. C. Guttridge, C. Albanese, J. Y. Reuther, R. G. Pestell, and A. S. Baldwin, "NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 8, pp. 5785–5799, 1999.
- [75] M. Hinz, D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, and M. Strauss, "NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 4, pp. 2690–2698, 1999.
- [76] E. Albi, G. Rossi, N. M. Maraldi et al., "Involvement of nuclear phosphatidylinositol-dependent phospholipases C in cell cycle progression during rat liver regeneration," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 197, no. 2, pp. 181–188, 2003.
- [77] B. H. Zhang and G. C. Farrell, "Chronic ethanol consumption disrupts complexation between EGF receptor and phospholipase C- γ 1: relevance to impaired hepatocyte proliferation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 257, no. 1, pp. 89–94, 1999.
- [78] T. K. Guren, H. Abrahamsen, G. H. Thoresen, E. Babaie, T. Berg, and T. Christoffersen, "EGF-induced activation of Stat1, Stat3, and Stat5b is unrelated to the stimulation of DNA synthesis in cultured hepatocytes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 258, no. 3, pp. 565–571, 1999.
- [79] J. Zhang, J. Y. Ji, M. Yu et al., "YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway," *Nature Cell Biology*, vol. 11, no. 12, pp. 1444–1450, 2009.
- [80] C. Wang, L. Zhang, Q. He et al., "Differences in Yes-associated protein and mRNA levels in regenerating liver and hepatocellular carcinoma," *Molecular Medicine Reports*, vol. 5, no. 2, pp. 410–414, 2012.
- [81] K. P. Lee, J. H. Lee, T. S. Kim et al., "The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 18, pp. 8248–8253, 2010.
- [82] L. Lu, Y. Li, S. M. Kim et al., "Hippo signaling is a potent *in vivo* growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 4, pp. 1437–1442, 2010.
- [83] H. Song, K. K. Mak, L. Topol et al., "Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 4, pp. 1431–1436, 2010.
- [84] M. P. Sanderson, P. J. Dempsey, and A. J. Dunbar, "Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors," *Growth Factors*, vol. 24, no. 2, pp. 121–136, 2006.
- [85] U. Sahin, G. Weskamp, K. Kelly et al., "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands," *Journal of Cell Biology*, vol. 164, no. 5, pp. 769–779, 2004.
- [86] D. C. Lee, S. W. Sunnarborg, C. L. Hinkle et al., "TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 995, pp. 22–38, 2003.
- [87] C. L. Hinkle, S. W. Sunnarborg, D. Loiselle et al., "Selective roles for tumor necrosis factor α -converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family. The juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 23, pp. 24179–24188, 2004.
- [88] G. M. Argast, J. S. Campbell, J. T. Brooling, and N. Fausto, "Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 33, pp. 34530–34536, 2004.
- [89] X. M. Lin, Y. B. Liu, F. Zhou, Y. L. Wu, L. Chen, and H. Q. Fang, "Expression of tumor necrosis factor- α converting enzyme in liver regeneration after partial hepatectomy,"

- World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 9, pp. 1353–1357, 2008.
- [90] S. Ekberg, M. Luther, T. Nakamura, and J. O. Jansson, "Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy," *Journal of Endocrinology*, vol. 135, no. 1, pp. 59–67, 1992.
- [91] P. A. Pennisi, J. J. Kopchick, S. Thorgerirsson, D. Leroith, and S. Yakar, "Role of Growth Hormone (GH) in liver regeneration," *Endocrinology*, vol. 145, no. 10, pp. 4748–4755, 2004.
- [92] A. Zerrad-Saadi, M. Lambert-Blot, C. Mitchell et al., "GH receptor plays a major role in liver regeneration through the control of EGFR and ERK1/2 activation," *Endocrinology*, vol. 152, no. 7, pp. 2731–2741, 2011.
- [93] L. Blaas, J. W. Kornfeld, D. Schramek et al., "Disruption of the growth hormone-signal transducer and activator of transcription 5-insulinlike growth factor 1 axis severely aggravates liver fibrosis in a mouse model of cholestasis," *Hepatology*, vol. 51, no. 4, pp. 1319–1326, 2010.
- [94] C. Desbois-Mouthon, D. Wendum, A. Cadoret et al., "Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout," *The FASEB Journal*, vol. 20, no. 6, pp. 773–775, 2006.
- [95] R. Reinehr and D. Häussinger, "CD95 death receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver cell apoptosis and regeneration," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 518, no. 1, pp. 2–7, 2012.
- [96] C. Torre, S. Benhamouche, C. Mitchell et al., "The transforming growth factor- α and cyclin D1 genes are direct targets of β -catenin signaling in hepatocyte proliferation," *Journal of Hepatology*, vol. 55, no. 1, pp. 86–95, 2011.
- [97] S. Sekine, P. J. A. Gutiérrez, B. Y. A. Lan, S. Feng, and M. Hebrok, "Liver-specific loss of β -catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy," *Hepatology*, vol. 45, no. 2, pp. 361–368, 2007.
- [98] X. Tan, U. Apte, A. Micsenyi et al., "Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in liver," *Gastroenterology*, vol. 129, no. 1, pp. 285–302, 2005.
- [99] X. Tan, J. Behari, B. Cieply, G. K. Michalopoulos, and S. P. S. Monga, "Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration," *Gastroenterology*, vol. 131, no. 5, pp. 1561–1572, 2006.
- [100] J. C. Bucuvalas, J. A. Horn, and S. D. Chernauek, "Resistance to growth hormone in children with chronic liver disease," *Pediatric Transplantation*, vol. 1, no. 1, pp. 73–79, 1997.
- [101] N. Assy, Y. Pruzansky, D. Gaitini, Z. Shen Orr, Z. Hochberg, and Y. Baruch, "Growth hormone-stimulated IGF-1 generation in cirrhosis reflects hepatocellular dysfunction," *Journal of Hepatology*, vol. 49, no. 1, pp. 34–42, 2008.
- [102] T. Ichikawa, K. Nakao, K. Hamasaki et al., "Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease," *Hepatology International*, vol. 1, pp. 287–294, 2007.
- [103] M. Scacchi, A. I. Pincelli, and F. Cavagnini, "Growth hormone in obesity," *International Journal of Obesity*, vol. 23, no. 3, pp. 260–271, 1999.
- [104] C. L. Arteaga, "Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia," *Seminars in Oncology*, vol. 29, no. 5, pp. 3–9, 2002.
- [105] C. Berasain, J. Castillo, J. Prieto, and M. A. Avila, "New molecular targets for hepatocellular carcinoma: the ErbB1 signaling system," *Liver International*, vol. 27, no. 2, pp. 174–185, 2007.